

**Untersuchung von atherosklerotischen Prozessen in zirkulierenden
Monozyten und T-Zellen von Patienten mit Familiärer
Hypercholesterinämie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

von

Sandy Mosig
Diplom-Biochemiker
geboren am 9. Januar 1976 in Eilenburg

Dissertation eingereicht am:	09. 11. 2006
1. Gutachter	Prof. Dr. R. Wetzker
2. Gutachter	Prof. Dr. H. Funke
3. Gutachter	Prof. Dr. K. Oette
Mündliche Prüfung am	21.12.2006
Verteidigung am	12.2.2007

Für meine Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	1-4
1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1-6
2	EINLEITUNG	2-8
2.1	DER LIPIDTRANSPORT IM BLUT	2-8
2.1.1	Die Hauptklassen der Lipoproteine	2-8
2.1.2	Der Lipoprotein-Metabolismus	2-9
2.1.3	Die Triglyceridreichen Lipoproteine.....	2-9
2.2	DIE REGULATION DER CHOLESTERINHOMÖOSTASE.....	2-10
2.2.1	Die LDL-Rezeptor-Familie	2-11
2.2.1.1	Der LDL-Rezeptor	2-11
2.2.1.2	Transkriptionelle Regulation des LDL-R	2-11
2.2.1.3	Die posttranskriptionelle Regulation des LDL-R	2-14
2.2.1.4	LDL Receptor Related Protein-1 (LRP1)	2-14
2.2.2	Der very low density lipoprotein receptor (VLDL-R)	2-15
2.3	DIE ATHEROSKLEROSE	2-15
2.3.1	Allgemeines	2-15
2.3.2	Die Risikofaktoren der Atherosklerose.....	2-16
2.3.3	Die zellulären und molekularen Aspekte der Atherosklerose.....	2-17
2.3.3.1	Allgemeines.....	2-17
2.3.3.2	Die Entstehung von Läsionen.....	2-18
2.3.3.3	Die Interaktionen zwischen Endothel und Leukozyten	2-19
2.3.3.4	Die Rolle von T-Zellen und deren Aktivierung bei der Plaqueentstehung	2-20
2.3.3.5	Die Rolle der Monozyten bei der Plaqueentstehung.....	2-21
2.3.3.5.1	Die Modifikationen von LDL	2-21
2.3.3.5.2	Die Scavenger Rezeptoren	2-21
2.3.3.5.2.1	Die Klasse A Scavenger Rezeptoren	2-22
2.3.3.5.2.2	Die Klasse B Scavenger Rezeptoren.....	2-22
2.3.3.5.2.3	Die Klasse D Scavenger Rezeptoren	2-23
2.3.3.5.2.4	Die Klasse H Scavenger Rezeptoren	2-23
2.3.3.5.3	Die Toll-like Rezeptoren.....	2-23
2.3.3.6	Fortgeschrittene Läsionen und Thrombose.....	2-24
2.4	GENETISCHE KRANKHEITEN UND ATHEROSKLEROSE	2-26
2.4.1	Monogen induzierte Hypercholesterinämien	2-29
2.4.2	Allgemeines	2-29
2.4.2.1	Familiäre Hypercholesterinämie.....	2-29
2.4.2.2	Das Krankheitsbild	2-29
2.4.2.3	Die Diagnose	2-31
2.4.2.4	Die Behandlung	2-31
3	MATERIAL UND METHODEN.....	3-33
3.1	STUDIENKOLLEKTIV	3-33
3.2	LDL-R-MUTATIONEN	3-33
3.3	ZELLISOLATION	3-33
3.4	MONOZYTENISOLATION UND KRYOKONSERVIERUNG FÜR DIE ZELLKULTUR.....	3-33
3.5	DIFFERENTIALBLUTBILD, BESTIMMUNG DER LIPIDWERTE UND oxLDL BESTIMMUNG	3-34
3.6	RNA EXTRAKTION	3-34
3.7	MIKROARRAY ANALYSEN	3-35
3.8	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	3-36
3.9	LDL-ISOLATION, PRÄPARATION UND MARKIERUNG.....	3-36
3.10	BINDUNGS- UND AUFNAHMESTUDIEN	3-37
3.11	DURCHFLUßZYTOMETRIE.....	3-37
3.12	WESTERN BLOT ANALYSEN.....	3-39
3.13	STATISTISCHE ANALYSE UND GRAFISCHE AUFBEREITUNG	3-39
4	RESULTATE.....	4-40

4.1	VORARBEITEN ZUR UNTERSUCHUNG DER GEP VON WEIßEN BLUTZELLEN.....	4-40
4.1.1	Prinzipielle Unterschiede in den GEP verschiedener Populationen weißer Blutzellen	4-40
4.1.2	Die GEP weißer Blutzellen reflektieren physiologische Prozesse.....	4-44
4.2	UNTERSUCHUNGEN AN MONOZYTEN UND T-ZELLEN VON PATIENTEN MIT FAMILIÄRER	
	HYPERCHOLESTERINÄMIE	4-46
4.2.1	Studienkollektiv	4-46
4.2.2	Mikroarray-Analysen	4-47
4.2.3	In FH-Monozyten sind die Gene des SREBP-Signalweges herabreguliert	4-51
4.2.4	Die Gene, die für Proteine des Cholesterin-Metabolismus´ kodieren, sind in T-Zellen homozygoter FH-Patienten heraufreguliert.	4-53
4.2.5	Einfluss einer Statin-Therapie auf die HMGCR-Expression.....	4-54
4.2.6	Monozyten homozygoter und heterozygoter FH-Patienten zeigen einen erhöhte Expression von Scavenger Rezeptoren	4-55
4.2.7	Homozygote FH-Patienten haben erhöhte Serum-oxLDL-Werte.....	4-59
4.2.8	Monozyten von homozygoten FH-Patienten nehmen verstärkt oxLDL auf.	4-60
4.2.9	Die vermehrte oxLDL Aufnahme durch homozygote FH-Monozyten führt zu einem Anstieg der Gesamtzahl an apoptotischen und toten Zellen	4-61
4.2.10	CD36 ist der Hauptrezeptor für die Aufnahme von oxLDL in Monozyten.....	4-63
4.2.11	FH-Patienten weisen eine reduzierte Gesamtzahl an CD16 ⁺ Monozyten auf.	4-64
4.2.12	Monozyten von FH-Patienten präsentieren auf ihrer Zelloberfläche vermehrt Adhäsionsmoleküle und weisen DC-Differenzierungsmerkmale auf.	4-65
5	DISKUSSION	5-68
5.1	DIE AUFRÄUMLICUNG EINZELNER ZELLTYPEN FÜHRT ZUR STEIGERUNG DER SENSITIVITÄT VON MIKROARRAYANALYSEN.	5-68
5.2	MONOZYTEN UND T-ZELLEN VON PATIENTEN MIT FAMILIÄRER HYPERCHOLESTERINÄMIE REAGIEREN IN UNTERSCHIEDLICHER WEISE AUF DEN LDL-R DEFECT.	5-69
5.3	MONOZYTEN UND T-ZELLEN VON FH-PATIENTEN HABEN UNTERSCHIEDLICHE STRATEGIEN FÜR DIE BEREITSTELLUNG INTRAZELLULÄREN CHOLESTERINS.	5-70
5.4	TROTZ LDL-R DEFECTS SIND FH MONOZYTEN IN DER LAGE, oxLDL ZU BINDEN UND ZU INTERNALISIEREN.....	5-71
5.5	CD36 IST DER HAUPTREZEPTOR FÜR DIE AUFNAHME VON oxLDL DURCH MONOZYTEN.	5-72
5.6	DIE GESTEIGERTE AUFNAHME VON oxLDL WIRKT ZYTOTOXISCH IN FH-MONOZYTEN.	5-73
5.7	DIE ABWESENHEIT VON SCAVENGER REZEPTOREN AUF T-ZELLEN KANN DIE UNTERSCHIEDE IN DEN REGULATIONSMECHANISMEN BEIDER ZELLTYPEN BEI FH-PATIENTEN ERKLÄREN.	5-74
5.8	MÖGLICHE KONSEQUENZEN EINER STATINTHERAPIE AUF DAS IMMUNSYSTEM HOMOZYGOTER FH- PATIENTEN.....	5-74
5.9	DIE MONOZYTEN VON FH-PATIENTEN EXPRIEMIEREN VERMEHRT ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	5-75
5.10	DIE FH-PATIENTEN WEISEN EINEN GERINGEREN ANTEIL AN CD14 ⁺ CD16 ⁺ -MONOZYTEN AUF.	5-76
5.11	VORGESCHLAGENES MODELL ZUR ATHEROSKLEROSEENTSTEHUNG BEI FH-PATIENTEN	5-76
5.12	DIE BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE FÜR DIE THERAPIE UND DIAGNOSE DER FAMILIÄREN HYPERCHOLESTERINÄMIE	5-80
6	LITERATURVERZEICHNIS	6-81
II.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	6-103
III.	DANKSAGUNG	6-104
IV.	LEBENS LAUF.....	6-105
V.	PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE.....	6-106
VI.	ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN	6-108

1 Zusammenfassung

Atherosklerose und damit assoziierte Krankheiten, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, sind für mehr als 50% aller Todesfälle in westlichen Gesellschaften verantwortlich (1). Die Atherosklerose ist gekennzeichnet durch Ansammlungen von Lipiden und fibrösen Partikeln innerhalb der großen Arterien. Im weiteren Verlauf der Krankheit, kommt es zu einem Überwachsen dieser Ansammlungen durch Endothelzellen, dem Einwandern von Lymphozyten, Zellen der glatten Muskulatur und Monozyten, welche sich durch exzessive Aufnahme modifizierter Lipoproteine zunächst in Schaumzellen umwandeln und dann absterben. Hierdurch entsteht der atherosklerotische Plaque, welcher das Lumen der Gefäße erheblich reduzieren kann. Nach heutigem Verständnis wird die Atherosklerose vor allem als eine entzündliche Krankheit angesehen (1, 2). Die damit verbundenen Reaktionen werden in erster Linie durch Monozyten und T-Zellen vermittelt, welche aufgrund verschiedener molekularer und zellulärer Interaktionen im weiteren Verlauf der Krankheit zu einer Destabilisierung der atherosklerotischen Plaques beitragen. Diese Destabilisierung wird als ein größeres Risiko für das Auftreten von Herzinfarkten angesehen als die Lumeneinengung. Durch das Aufreißen der fibrösen Kappe, welche den Plaque überzieht, kommt es zur Freisetzung des nekrotischen Kerns des Plaques und zur Bildung eines Thrombus, welcher im Blut transportiert wird und zu einem akuten Gefäßverschluss und somit zu einem Herzinfarkt oder Schlaganfall führen kann (3-6). Einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose ist eine stark erhöhte Serum-Cholesterinkonzentration. Der überwiegende Teil des Cholesterins wird im Blut als Bestandteil der „Low Density Lipoproteine“ (LDL) gebunden (1). Dies erklärt, warum Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie (FH), welche aufgrund eines LDL-Rezeptordefekts eine stark erhöhte Serum-LDL-Konzentration aufweisen, ein überdurchschnittlich hohes Risiko für die Entwicklung von atherosklerotisch bedingten Krankheiten aufweisen. Abhängig von der Schwere der LDL-Rezeptor (LDL-R) Mutationen und der Anwesenheit weiterer genetischer oder Umweltfaktoren, können homozygote FH-Patienten bereits im Kindesalter einen Herzinfarkt oder Schlaganfall erleiden (7-10).

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der Untersuchung von Genexpressionsprofilen (GEP) von Monozyten und T-Zellen weitergehende Erkenntnisse über die molekularen und zellulären Vorgänge in diesen Zellen bei der Entwicklung der Atherosklerose von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass GEP von Monozyten und T-Zellen von FH-Patienten sich von denen gesunder Kontrollprobanden unterscheiden. Hierbei wurden die größten Unterschiede in der transkriptionellen Regulation der Monozyten festgestellt. Darüber hinaus existieren bei FH-Patienten prinzipielle Unterschiede in der Regulation des Cholesterin-Metabolismus zwischen Monozyten und T-Zellen. Die Monozyten dieser Patienten sind überraschenderweise trotz eines LDL-R Defekts in der Lage, native LDL in gleichem Umfang zu binden und zu internalisieren wie gesunde Kontrollprobanden. Weiterhin konnte für Monozyten von FH-Patienten nachgewiesen werden, dass diese sowohl dosis- als auch zeitabhängig mehr oxidierte LDL (oxLDL) aufnehmen. Diese verstärkte Aufnahme von oxLDL ging mit einer erhöhten Apoptose-Rate und einer gesteigerten Zahl toter Zellen einher. Mittels verschiedener Techniken, wie Mikroarray-Analysen, quantitativer Real-time PCR, Western Blot und Durchflußzytometrie, wurde auf transkriptioneller und

translationaler Ebene eine verstärkte Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LRP1, CD68 und Stabilin-1 in FH-Monozyten nachgewiesen, wobei CD36 als der Hauptrezeptor für die Aufnahme von oxLDL identifiziert werden konnte. In T-Zellen von FH-Patienten wurden keine Hinweise auf alternative Wege zur Aufnahme von LDL gefunden. In diesen Zellen wurde jedoch eine Heraufregulation von zwei Schlüsselenzymen der *de novo* Cholesterinbiosynthese nachgewiesen. Dies legt nahe, dass T-Zellen einen LDL-R Defekt und den damit verbundenen Cholesterinmangel durch Heraufregulation der Cholesterinbiosynthese kompensieren. Die T-Zellen homozygoter FH-Patienten wiesen zudem einen höheren Aktivierungsgrad auf als die von Kontrollpersonen. Dieser beruht vermutlich auf den bei diesen Patienten festgestellten erhöhten Serumkonzentrationen von oxLDL.

Neben Unterschieden im Cholesterin-Metabolismus wurden Differenzen bei der Expression von Adhäsionsmolekülen in Monozyten festgestellt. Monozyten von FH-Patienten wiesen eine erhöhte Expression von Intergrin-beta-1 auf, welches die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen vermittelt. Zusätzlich wurde ein verringerter prozentueller Anteil von CD16⁺-Monozyten bei FH-Patienten festgestellt. Diese „residenten“ Monozyten zeigten bei FH-Patienten darüber hinaus eine erhöhte Expression von CD11c, was als ein Anzeichen für eine Differenzierung dieser Monozyten zu Dendritischen Zellen gewertet werden kann.

Die Ergebnisse weisen ein diagnostisches Potential der Genexpressionsprofile von Monozyten und T-Zellen bei der Untersuchung von Hypercholesterinämien nach. Es wurden erstmals Vorgänge in primären, zirkulierenden Leukozyten dokumentiert, von denen angenommen wurde, dass diese nur im subendothelialen Raum stattfinden. Die Gesamtheit aller Ergebnisse erlaubt es, das allgemein akzeptierte Modell zur Atheroskleroseentwicklung, welches auf Vorgänge in der Gefäßwand und im subendothelialen Raum fokussiert ist, um Beiträge zirkulierender Blutzellen zu erweitern.

2 Einleitung

2.1 Der Lipidtransport im Blut

Die Versorgung der peripheren Organe mit Lipiden erfolgt zum Großteil über das Blut. Bei diesen Lipiden handelt es sich vor allem um Cholesterin und Cholesterinester, Phosphoglyceride, Triacylglycerine und in geringen Mengen unveresterte langkettige Fettsäuren. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Lipide bedarf es spezieller Proteine für ihren Transport. Diese Proteine werden als Apolipoproteine bezeichnet. Die Komplexe aus Lipiden und Apolipoproteinen bilden die Lipoproteine.

2.1.1 Die Hauptklassen der Lipoproteine

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte, lassen sich die Lipoproteine in 5 verschiedene Klassen unterteilen. Dabei sinkt mit zunehmender Dichte das Verhältnis von transportiertem Lipid zum Proteinanteil des Lipoproteins. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Lipoproteine ist ihr Gehalt an speziellen Apolipoproteinen (Tabelle 1).

Lipoprotein	Dichte	Durchmesser	Zusammensetzung	spezifische Apolipoproteine	Bildungsort
Chylomikronen	0,9g/ml	100-1000nm	85% Triglycerine, 15% Protein	apoAI, apoAIV, apoCI-CIII, apoE, apoB ₄₈ , apoH	Darm
VLDL	>0,9g/ml - <1,006g/ml	25-90nm	55% Triglycerine, 20% Cholesterin, 25% Protein	apoCI-CIII, apoE, apoB ₁₀₀	Leber
IDL	>1,006g/ml - <1,019g/ml	40nm	35% Cholesterin, 25% Triglycerine, 40% Protein	apoB ₁₀₀ , apoE	Leber und aus VLDL
LDL	>1,019g/ml - <1,063g/ml	15-25nm	60% Cholesterin, 55% Triglycerine, 35% Protein	apoB ₁₀₀ , (z.T. apoC, apoE)	Leber und aus IDL
HDL	>1,063g/ml - <1,21g/ml	6-12nm	25% Phospholipide, 20% Cholesterin, 5% Triglycerine, 50% Protein	apoAI, apoAII, apoAIV, apoCI-CIII, apoE	Leber, Darm, Plasma

Tabelle 1 Eigenschaften und Zusammensetzung humaner Lipoproteine (11)

Strukturell lassen sich Apolipoproteine in 2 Klassen aufteilen: 1) die wasserunlöslichen, unter den Lipoproteinen nicht austauschbaren Proteine ApoB₄₈ und ApoB₁₀₀, und 2) die in freier Form löslichen Apolipoproteine A, C, D und E, welche zwischen den Lipoproteinen ausgetauscht werden können. Auf die einzelnen Funktionen dieser Apolipoproteine soll hier nicht näher eingegangen werden.

2.1.2 Der Lipoprotein-Metabolismus

2.1.3 Die Triglyceridreichen Lipoproteine

Chylomikronen entstehen in den Mucosazellen der duodenalen Schleimhaut und sind für den Transport der im Darm resorbierten Triacylglyceride verantwortlich. Die „very low density lipoprotein“ (VLDL) Partikel werden vor allem in der Leber gebildet und vermitteln den Transport der endogen in der Leber gebildeten Triglyceride. Obwohl beide Partikel vor allem für den Transport von Triglyceriden zuständig sind, erfolgt ihr Abbau auf unterschiedliche Weise.

Kurz nach dem Erscheinen der Chylomikronen im Blut, erfolgt in Abhängigkeit von der „high density lipoprotein“ (HDL) Konzentration (im besonderen HDL₂) ein Austausch der Apolipoproteine C und E mit den HDL-Partikeln. Dabei ist das ApoCII von besonderer Bedeutung, da es sich hierbei um einen Cofaktor der Lipoprotein-Lipase handelt, welcher sich an den Endothelzellen der Kapillaren sowie der Plasmamembran extrahepatischer Zellen befindet. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Triacylglycerin in Glycerin und Fettsäuren. Hierbei werden die Fettsäuren vom umgebenden Gewebe aufgenommen und die Glycerine zusammen mit den Chylomikron-Überbleibseln, den sogenannten „remnants“, zurück zur Leber transportiert, wo sie verstoffwechselt werden.

VLDL-Partikel treten nach ihrer Sezernierung durch die Leber, ähnlich wie Chylomikronen, in eine Wechselwirkung mit HDL und übernehmen dabei ApoE und ApoC. Ähnlich wie bei den Chylomikronen werden den VLDL-Partikeln peripher Fettsäuren durch die Lipoprotein-Lipase entzogen. Die so entstehenden „intermediate density lipoprotein“ (IDL) Partikel werden nach weiterer Hydrolyse und dem Verlust der C- und E- Apolipoproteine zu LDL. Zusätzlich wird LDL auch *de novo* von der Leber synthetisiert. Diese besonders cholesterin- und cholesterinesterreichen Partikel transportieren anschliessend ihre Fracht zu den peripheren Geweben (Abbildung 2-1).

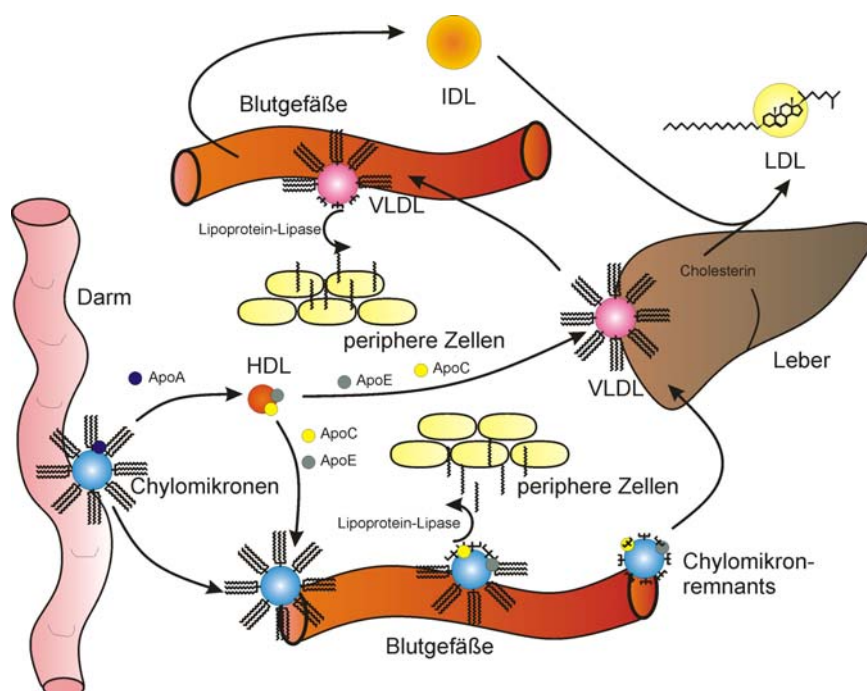


Abbildung 2-1
Systematische
Darstellung des
humanen Lipoprotein
Metabolismus

Der Transport überschüssigen Cholesterins aus dem peripheren Gewebe zurück zur Leber, wird als Reverser Cholesterin Transport (RCT) bezeichnet. Dabei sind im Zusammenhang mit Atherosklerose, Makrophagen im peripheren Gewebe von besonderer Bedeutung, da sich aus ihnen bei einem gestörten RCT Schaumzellen bilden können, die zur Entstehung von Atherosklerose beitragen. Auf die hierbei wichtigen Vorgänge wird in Kapitel 3.3. genauer eingegangen. Beim RCT wird apoAI von der Leber und dem Darm sezerniert und unter Zuhilfenahme des ATP-binding cassette A1 (ABCA1) Transporterproteins mit Cholesterin und Phospholipiden beladen. Die so geformten pre- β -HDL Partikel nehmen dann ebenfalls über ABCA1 Cholesterin von Makrophagen und peripheren Zellen auf und bilden die HDL₂ Partikel. Diese können anschliessend weiter mit Cholesterin aus Makrophagen über ATP-binding cassette G1 ABCG1 und möglicherweise Scavenger Receptor BI (SR-BI) beladen werden. HDL ist in der Lage, Cholesterin über SR-BI an Leberzellen abzugeben. Das Cholesterinestertransferprotein (CETP) und Phospholipidtransferprotein (PLTP) führen zu einem weitgehenden Umbau des HDLs und einer Umverteilung seiner strukturellen Komponenten auf andere Lipoproteine. Ein kleiner Teil der HDL wird zu triglyceridreichen, ApoE-haltigen Partikeln umgebaut, die von der Leber aufgenommen werden (Abbildung 2-2).

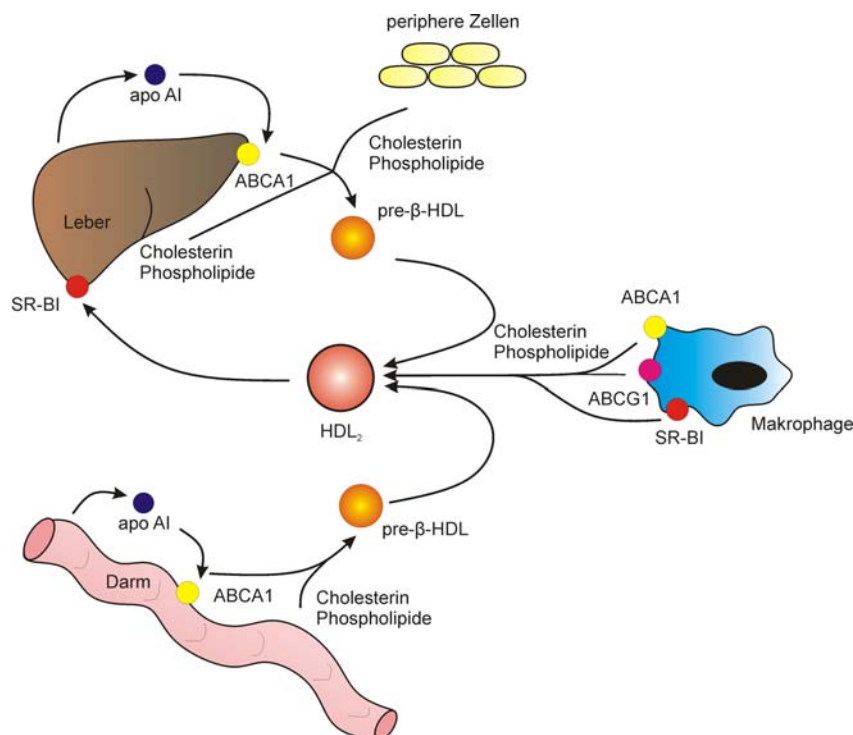


Abbildung 2-2
Schematische Darstellung
des Reversen Cholesterin
Transports

2.2 Die Regulation der Cholesterinhomöostase

Die Regulation der Cholesterinhomöostase wird in Säugerzellen vor allem durch Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie gesteuert. Eine Störung dieser Homöostase resultiert in verschiedenen Krankheiten, von denen die Atherosklerose aufgrund ihrer hohen Prävalenz in westlichen Gesellschaften die prominenteste ist. Nachfolgend soll auf die wichtigsten Vertreter der LDL-Rezeptor-Familie näher eingegangen werden.

2.2.1 Die LDL-Rezeptor-Familie

Die Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie binden eine Vielzahl verschiedener Liganden, wie zum Beispiel Lipoproteine, Proteinasen und Proteinase-Inhibitor-Komplexe. Nach der Aufnahme des Rezeptor-Liganden-Komplex durch Endozytose werden die Liganden im Endosom aufgrund des vorherrschenden niedrigen pH-Werts von ihren Rezeptoren entkoppelt und meist degradiert. Die Rezeptoren werden anschliessend wieder zur Zelloberfläche transportiert, wo sie weitere Liganden binden können. Um einer Überladung der Zelle vorzubeugen, können die Rezeptoren alternativ auch zusammen mit ihren Liganden im Endosom degradiert werden. Obwohl die zelluläre Aufnahme von Liganden eine wichtige Aufgabe der Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie ist, gibt es Hinweise darauf, dass sie zudem verschiedene Aufgaben in der Regulation der Signaltransduktion haben (12). Im Folgenden soll auf den LDL Rezeptor, das „LDL Receptor Related Protein-1“ (LRP1) und den „Very Low Density Lipoprotein Receptor“ (VLDL) näher eingegangen werden.

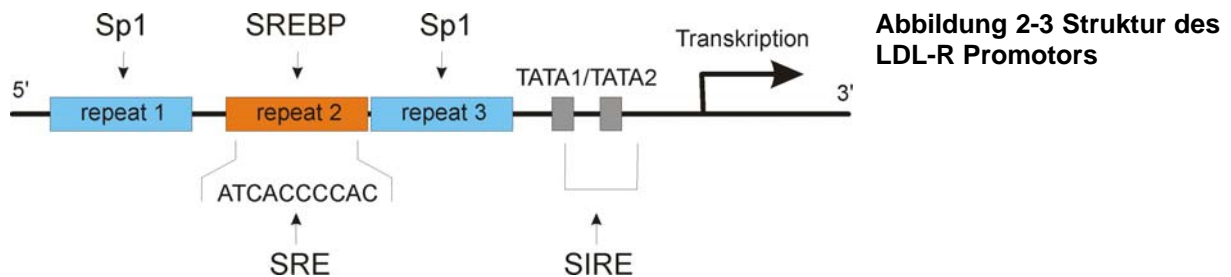
2.2.1.1 Der LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor (LDL-R) wurde 1974 erstmals von Goldstein und Brown in humanen Fibroblasten entdeckt (13, 14). Seitdem ist er in Hinblick auf Struktur, vorkommende Mutationen, Physiologie, sowie den Möglichkeiten seiner pharmakologischen Steuerung ausgiebig untersucht worden (15). Es handelt sich bei diesem Rezeptor um ein membrandurchspannendes Glykoprotein, dessen Struktur zwischen Menschen und verschiedenen weiteren Spezies hoch konserviert ist (16). Er wird als Vorläuferprotein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, anschließend durch Glykosylierung und Abspaltung von Signalpeptiden im Golgi-Netzwerk in seine endgültige Faltung gebracht und zur Membran transportiert. An der Zellmembran gelangt er dann in die so genannten „coated pits“. Dies sind Bereiche der Plasmamembran, welche besonders reich an dem für die Vesikelbildung wichtigen Protein Clathrin sind und daher Orte der verstärkten Vesikelbildung darstellen (17-20). Die wichtigste Aufgabe des LDL-R ist die Regulation der zellulären Cholesterinhomöostase, indem er die Aufnahme von Apolipoprotein E (ApoE) und Apolipoprotein B (ApoB) -haltiger Lipoproteine vermittelt, welche Cholesterin im Blut transportieren. Im menschlichen Körper wird dieser Rezeptor vor allem in der Leber exprimiert und ist hier für 70% der LDL Aufnahme aus dem Blut verantwortlich (21). Mutationen im LDL-R führen zu erhöhten Serum-Cholesterin Werten und dadurch zu einem erhöhten Risiko für Atherosklerose (10).

2.2.1.2 Transkriptionelle Regulation des LDL-R

Die Promotorregion des LDL-R besteht aus 170bp und enthält drei Sequenzen mit je 16 Basenpaaren (bp) (repeat 1, 2 und 3) für die Bindung von Transkriptionsfaktoren, zwei TATA-ähnliche Sequenzen und verschiedene Transkriptionsinitiationsstellen, welche alle essentiell für die LDL-R Genexpression und -regulation sind (22). Die Transkription des LDL-R wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen reguliert: der Transkriptionsfaktor Sp1 vermittelt die basale Expression der LDL-R mRNA unabhängig von der intrazellulären Cholesterinmenge, indem er an die repeats 1 und 3 bindet (22, 23). Diese Bindung reicht jedoch nicht für eine hohe Expression des LDL-R in Abwesenheit von intrazellulärem Cholesterin aus. Dazu ist die Bindung eines weiteren Transkriptionsfaktors, dem Sterol-regulatorischen Bindungsprotein

(SREBP), an das repeat 2 notwendig, welches ein Sterol-regulatorisches-Element (SRE) enthält (Abbildung 2-3) (24).



SREBP spielt daher eine wichtige Rolle in der Cholesterin-abhängigen transkriptionellen Regulation des LDL-R und gehört zur Gruppe der „basic-helix-loop-helix-leucine zipper“ (bHLH Zip) Transkriptionsfaktoren (25, 26). Es konnte gezeigt werden, dass diese Gruppe der Transkriptionsfaktoren an das SRE-Motiv bindet. Dieses Motiv kommt neben dem LDL-R Promotor auch in anderen Promotoren vor, welche die Expression von Proteinen der Cholesterin- und Fettsäure-Biosynthese steuern. Ein Beispiel ist die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGCR), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der *de novo* Cholesterin-Biosynthese (25-28).

Es gibt drei Mitglieder der SREBP-Familie in Säugerzellen, SREBF-1a, SREBF-1c und SREBF-2, welche alle eine unterschiedliche Selektivität für verschiedene Zielgene aufweisen (29). SREBF-2 ist dabei der wichtigste Initiator für die LDL-R Transkription (30). Die SREBPs werden als inaktive Vorläufermoleküle im ER synthetisiert und in die Membran des ER eingebaut. Sie bestehen aus etwa 1.150 Aminosäuren, haben ein Molekulargewicht von etwa 125kDa und bestehen aus 3 funktionell unterschiedlichen Domänen, welche eine Haarnadelstruktur in der ER-Membran bilden. Das transkriptionsaktivierende bHLH-Zip-Motiv ist in der aminoterminalen Domäne enthalten (31). Um in den Nukleus zu gelangen und dort die Transkription der jeweiligen Zielgene zu vermitteln, müssen die SREBP-Vorläufer vom ER in den Golgi gelangen, wo die aminoternale Domäne freigesetzt wird (32). Zum Transfer der SREBPs vom ER zum Golgi ist die Eskortierung durch das „SREBP-cleavage activating protein“ (SCAP) notwendig. SCAP besteht aus 1.276 Aminosäuren und kann in zwei funktionelle Domänen aufgeteilt werden (33). Die aminoternale Domäne besteht aus 8 membran-durchspannenden Helices, wobei die Helices 2-6 eine Sterol-sensitive Domäne (sterol sensing domain, SSD) bilden (33). Die carboxyterminale Domäne von SCAP vermittelt die Protein/Protein Interaktion mit SREBP und formt den SREBP/SCAP Komplex (33, 34) (Abbildung 2-4).

Verfügt die Zelle über ausreichend Cholesterin, wird der SREBP Signalweg blockiert und die Transkription des LDL-R verhindert. Cholesterin kann dabei direkt an die SSD von SCAP binden und erzeugt so eine Konformationsänderung, welche es SCAP erlaubt, an die ER-Membranproteine INSIG1 und INSIG2 (insulin-induced genes 1 bzw. 2) zu binden. Auf diese Weise wird ein ternärer SREBP/SCAP/INSIG-Komplex in der Gegenwart von Cholesterin gebildet, welcher in der ER-Membran festgehalten wird und so den Transport von SREBP in den Golgi verhindert. Auf diese Weise wird die Prozessierung von SREBP verhindert und Gene für die

Aufnahme und Synthese von Cholesterin werden nicht transkribiert (35-39) (Abbildung 2-4).

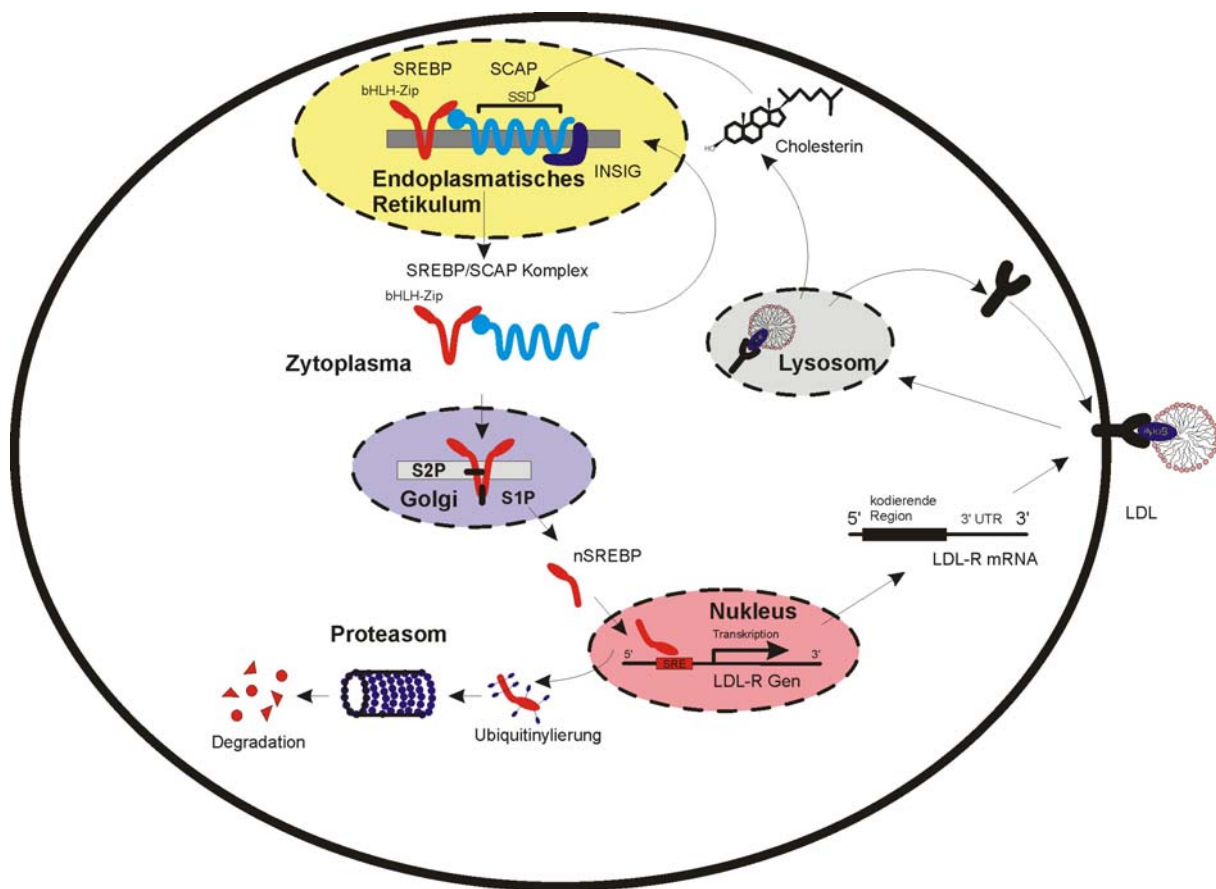


Abbildung 2-4 Steuerung der LDL-R Transkription durch den SREBP Signalweg

Ist jedoch kein Cholesterin in der Zelle vorhanden, interagiert SCAP nicht mit INSIG1/2 und der SREBP/SCAP-Komplex kann das ER verlassen (40). Nachdem SREBP in den Golgi gelangt ist, wird die transkriptionell aktive Domäne durch zwei proteolytische Prozesse freigesetzt und SCAP zurück in das ER transportiert (41, 42). Die Proteolyse von SREBP wird durch die Serin-Protease S1P und die Zink-Metalloprotease S2P vermittelt (43, 44). Nach der Proteolyse von SREBP wird das nukleäre SREBP (nSREBP) frei, kann in den Nukleus transportiert werden und dort die Transkription seiner Zielgene vermitteln. Hierdurch werden die Aufnahme von Cholesterin über den LDL-R gesteigert und Gene für die Cholesterin-Biosynthese angeschaltet (41-44). Nachdem nSREBP seine transkriptionelle Funktion erfüllt hat, wird es relativ schnell polyubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Seine mittlere Halbwertszeit beträgt etwa 3 Stunden (45).

Zusätzlich zu Cholesterin kann die Transkription des LDL-R auch durch Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren und „second messenger“ hoch- bzw. herunterreguliert werden. Unter den Hormonen erhöhen Östrogene, wie 17-beta-Estradiol, die LDL-R Expression in der Leber dramatisch (46, 47). Dabei bindet der Östrogen-Rezeptor- α nach Aktivierung an Sp1 und führt durch Bindung an das östrogenbindende Motiv im repeat 3 des LDL-R-Promotors zur gesteigerten Transkription des LDL-R. Dies erklärt die deutliche Senkung des Plasma-Cholesterins nach Östrogeninfusion,

welche sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen beobachtet wurde (48-50). Ein weiteres Hormon, das über einen nukleären Rezeptor wirkt und eine Bindungsstelle im Promotor des LDL-R aufweist, ist Triiodthyronin (51, 52). In klinischen Studien und im Tiermodell konnte eine enge Assoziation zwischen Hypothyroidismus und Hypercholesterinämie beobachtet werden. Weitere Untersuchungen offenbarten, dass eine Thyroidhormon-Therapie zu einer positiven Beeinflussung des Lipidprofils durch Heraufregulation des hepatischen LDL-R führt (53, 54).

Zudem ist Insulin in der Lage die LDL-R Expression in Hepatozyten und mononukleären Zellen zu steigern (55, 56). Hierbei sind ein intaktes SRE-Motiv, und die Beteiligung von SREBPs essentiell (57). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass Erk in der Lage ist SREBF-1a und SREBF2 zu phosphorylieren, wodurch die Trans-Aktivität dieser Faktoren reguliert wird (58-61).

2.2.1.3 Die posttranskriptionelle Regulation des LDL-R

Neue Daten weisen darauf hin, dass die Transkription des LDL-R auch posttranskriptional über die Stabilität der LDL-R mRNA gesteuert wird. Die LDL-R mRNA hat eine verhältnismäßig kurze Halbwertszeit von etwa 45min in HepG2 Zellen, wobei ihre Stabilität vor allem durch die Struktur der 3'-nicht-translatierten Region (3'UTR) bestimmt wird. Innerhalb dieser 3'UTR befinden sich drei AU-reiche Elemente (AREs), welche sich auch bei anderen kurzlebigen mRNAs nachweisen lassen (62, 63). Es konnte gezeigt werden, dass die Fusion der AREs in der 3'UTR der LDL-R-mRNA mit dem β -globin-Gen zu einer zehnfach beschleunigten Degradation der LDL-R-mRNA führt. Darüber hinaus konnte eine Funktion dieser AREs bei der Steuerung der mRNA-Stabilität im Tiermodell nachgewiesen werden. Transgene Mäuse, welche eine Deletion in zwei AREs des LDL-R Gens aufweisen, haben eine dreifach erhöhte Stabilität der LDL-R mRNA und eine 2,5-fach erhöhte Expression des LDL-R in der Leber, verglichen mit der Wildtypform dieser Mäuse (62, 64).

2.2.1.4 LDL Receptor Related Protein-1 (LRP1)

Das „LDL Receptor Related Protein-1“ (LRP1) gehört ebenfalls zur LDL-R Familie. Im Gegensatz zum LDL-R, welcher in der Gegenwart hoher Mengen LDL herabreguliert ist, wird LRP1 bei hohen intrazellulären Konzentrationen von Cholesterin vermehrt exprimiert. Diese Regulation wird ebenfalls über den SREBP-Weg vermittelt. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigte, dass SREBF2 für die cholesterinabhängige Expression von LRP1 verantwortlich ist, indem es eine inhibitorische Funktion auf die Transkription des LRP1 Promotors bei Cholesterinmangel ausübt (65).

LRP1 bindet eine Vielzahl verschiedener Liganden, darunter ApoE-haltige VLDL Partikel, Lipoprotein-Lipase (LPL) enthaltende triglycidreiche Lipoproteine, Lipoprotein-a (Lp(a)) und aggregiertes LDL (agLDL) (66-71). Obwohl die physiologische Relevanz von agLDL bei der Entstehung von Atherosklerose nicht vollständig geklärt ist, zeigen neue Studien, dass diese LDL-Form auch in der extrazellulären Matrix vorkommt (72, 73). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass die LRP1 vermittelte Aufnahme von Lipiden über agLDL durch humane koronare „vascular smooth muscle cells“ (VSMC) und Makrophagen zu einer

Akkumulation von intrazellulären Cholesterin führt und zur Schaumzellbildung beiträgt (74, 75). Neben dem „colony stimulating factor-1“ (CSF-1) und Insulin, führt auch agLDL zu einer erhöhten Transkription und Expression von LRP1 (76, 77). Diese Befunde wurden *in vivo* im Tiermodell an der Gefäßwand von Mäusen mit Hypercholesterinämie bestätigt (78). Klinische Studien weisen zudem eine Assoziation zwischen Koronarer Herzkrankheit (KHK) und LRP1, sowie eine erhöhte Expression von LRP1 in mononuklearen Blutzellen von Patienten mit Koronarverschuß nach (79-81).

Neben der Aufnahme von Lipoproteinen wurden noch weitere atheroskleroserelevante Funktionen von LRP1 beschrieben. So scheint LRP1 an der Modulation der Aktivität von Metalloproteinasen und somit an der Regulation der Plaquestabilität beteiligt zu sein (82). Weiterhin ist LRP1 in die Regulation der Oberflächenpräsentation von Adhäsionsmolekülen und in die Vermittlung der Phagozytose apoptotischer Zellen eingebunden (83, 84).

2.2.2 Der very low density lipoprotein receptor (VLDL-R)

Ähnlich wie LRP1 erkennt der VLDL-R eine Vielzahl verschiedener Liganden. Im Gegensatz zu LRP1 wird er jedoch nicht in der Leber exprimiert, sondern kommt vor allem in der Skelettmuskulatur, der Herzmuskulatur, dem Fettgewebe, dem Gehirn und dem Endothel vor (85-87). Nach seiner Entdeckung wurde dem VLDL-R vor allem eine Rolle im Metabolismus von Triglyceriden zugeschrieben. Es zeigte sich jedoch in Untersuchungen an VLDL-R^{-/-} knockout Mäusen, dass diese normale Serumtriglycerid- und -cholesterinwerte hatten. In LDL-R^{-/-} knockout Mäusen, welche den VLDL-R überexprimierten, konnte anschliessend eine Funktion des VLDL-R bei der Resorption von IDL nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, dass der VLDL-R der Hauptrezeptor für Serum-IDL ist und dass dessen Überexpression zu einer Reduktion von Serum-IDL und -LDL führt (88). Des weiteren konnte eine Rolle des VLDL-R im Katabolismus von Lp(a) nachgewiesen werden (89).

2.3 Die Atherosklerose

2.3.1 Allgemeines

Die Atherosklerose ist eine Krankheit der großen Arterien und die Hauptursache für koronare Herzkrankheit und Schlaganfall und somit für etwa 50% aller Todesfälle in westlichen Gesellschaften verantwortlich (1, 90). Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine progressive Krankheit, welche durch Akkumulation von Lipiden und fibrösen Partikeln innerhalb der Gefäßwand der großen Arterien gekennzeichnet ist. Frühe atherosklerotische Läsionen bestehen aus subendothelialen Anreicherungen cholesterinüberladener Makrophagen. Diese Zellen sind gekennzeichnet durch tröpfchenförmige Anreicherungen von Lipiden innerhalb ihres Zytoplasmas, wodurch bei deren Ansicht im Durchlichtmikroskop der Eindruck vom Schaum innerhalb der Zelle entsteht und sie daher auch als „Schaumzellen“ bezeichnet werden. Die ersten Charakteristika der Atheroskleroseentwicklung sind „fatty streaks“, welche Ansammlungen von lipid-reichen Makrophagen und vereinzelt T-Lymphozyten, Thrombozyten, Zellen der glatten Muskulatur (engl. smooth muscle cells, SMC) sowie von Mastzellen unterhalb des Endothels darstellen (91). Im Menschen wird diese Art von Läsionen bereits in der ersten Lebensdekade innerhalb der Aorta

beobachtet. In der zweiten Lebensdekade treten sie dann bereits in den Koronararterien und zwischen der dritten und vierten Lebensdekade innerhalb der cerebralen Arterien auf (1). Aufgrund von Unterschieden in der Stärke des Blutflusses innerhalb der Arterien, gibt es verschiedene bevorzugte Bereiche für die Ansiedlung von Läsionen. Hierzu gehören die Bögen größerer Gefäße. Obwohl das Vorhandensein von „fatty streaks“ klinisch nicht von Bedeutung ist, sind sie doch die Grundlage für die spätere Bildung von Atheromen, abnormalen entzündlichen Ansammlungen von Makrophagen und anderen weißen Blutzellen sowie fibröser Ablagerungen innerhalb der Arteriengefäßwand. Atherome, auch als Plaques bezeichnet werden, bilden sich nur in Arterienwänden und nicht in venösem Gewebe. Im weiteren Verlauf der Plaquebildung kommt es zur Ansammlung von lipidreichen nekrotischem Zellmaterial und zum Einwandern von SMC. Diese Läsionen sind überzogen von einer fibrösen Kappe, die aus SMC und Teilen der extrazellulären Matrix besteht und einen nekrotischen Kern umschließt. Beim weiteren Fortschreiten der Plaqueentwicklung kann es zur Kalzifizierung, Geschwürbildung und zum Einwachsen kleiner Blutgefäße aus der Arterienwand kommen. Obwohl vorangeschrittene Läsionen in der Lage sind, den Blutfluss zu unterbrechen, entstehen die meisten klinischen Komplikationen durch akuten Verschluss der Blutgefäße aufgrund von Thromben und Blutgerinnsel, deren Entstehung durch das Aufreißen der fibrösen Kappe begünstigt wird. Die wichtigsten Konsequenzen eines akuten thrombotischen Gefäßverschlusses sind Herzinfarkt und Schlaganfall.

2.3.2 Die Risikofaktoren der Atherosklerose

Epidemiologische Studien der letzten 50 Jahre haben eine Vielzahl von Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose aufgedeckt. Diese können in zwei Gruppen unterteilt werden. Erstens Risikofaktoren, die aufgrund genetischer Veranlagung bestehen, und zweitens Faktoren, welche vor allem durch Umwelt und Lebensführung bedingt sind. Der Zusammenhang zwischen beiden Gruppen von Faktoren und der Entwicklung von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit (KHK) ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Der wichtigste Risikofaktor für KHK ist das Lebensalter.

Faktoren mit einer starken genetischen Komponente	
erhöhtes LDL und VLDL	<ul style="list-style-type: none"> - Verschiedene epidemiologische Studien zeigen eine Assoziation zwischen erhöhtem LDL/VLDL und koronarer Herzkrankheit, welche durch verschiedene Studien von genetischen Krankheiten und im Tiermodell untermauert werden (92) - Klinische Studien zeigen einen positiven Effekt von cholesterinsenkenenden Mitteln auf den Verlauf der Atherosklerose (9, 92).
reduziertes HDL	<ul style="list-style-type: none"> - Epidemiologische Studien, monogene Krankheiten, sowie Untersuchungen an Tiermodellen zeigen eine Assoziation zwischen Atherosklerose und niedrigen HDL-Werten (93).
erhöhtes Lipoprotein(a) (Lp(a))	<ul style="list-style-type: none"> - Einige, aber nicht alle Studien, zeigen eine Assoziation von erhöhten Lp(a) –Konzentrationen im Blut und Atherosklerose (94, 95).
erhöhter Blutdruck	<ul style="list-style-type: none"> - Epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Blutdruck und KHK. - Klinische Studien zeigen eine positive Wirkung von Blutdrucksenkung für das Schlaganfall-Risiko (96, 97).
familiärer Hintergrund	<ul style="list-style-type: none"> - Unabhängig von anderen Risikofaktoren ist der familiäre Hintergrund ein signifikanter Risikofaktor (3).
Diabetes mellitus und Übergewicht	<ul style="list-style-type: none"> - Ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus, Übergewicht und Atherosklerose konnte in verschiedenen Studien und im

	Tiermodell nachgewiesen werden (92).
erhöhte Werte verschiedener hämostatischer Faktoren	- Eine unabhängige signifikante Assoziation zwischen KHK und erhöhter Fibrinogenkonzentration im Blut bzw. „plasminogen activator inhibitor type 1“ (PAI1), sowie zwischen gesteigerter Thrombozytenaktivität und KHK konnte nachgewiesen werden (98-100).
Geschlecht	- Unterhalb eines Alters von 60 Jahren haben Männer ein mehr als zweifach erhöhtes Risiko an KHK zu erkranken als Frauen (101)
systemische Entzündungen	- Erhöhte Serumkonzentrationen von C-reaktiven Protein, sowie entzündliche Krankheiten wie die rheumatische Arthritis stehen in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose und KHK (102, 103).
Metabolisches Syndrom	- Unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ wird eine Komplexe metabolische Störung zusammengefasst, bei der die Insulinresistenz einen zentralen Platz einnimmt. - Das Metabolische Syndrom zeigt eine enge Korrelation mit dem Entstehen von KHK (104).
Umweltbedingte Risikofaktoren	
fetteiche Ernährung	- Epidemiologische Studien zeigen eine starke Assoziation von Lebensführung, vor allem der Ernährung und KHK. - Ein erhöhtes Risiko durch fettreiche Ernährung konnte auch im Tiermodell nachgewiesen werden (92).
Rauchen	- Zahlreiche Studien zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Rauchen und KHK. - Das Einstellen des Rauchens führt zu einem deutlich niedrigeren Risikos für KHK (92).
geringe Serumkonzentrationen von Antioxidantien	- Fettlösliche Antioxidantien führen im Tiermodell zu einem reduziertem Risiko für die Entwicklung von Atherosklerose. - Klinische Studien zeigen kontroverse Ergebnisse (105).
zu wenig körperliche Bewegung	- Bewegungsmangel ist signifikant mit einem gesteigerten KHK-Risiko assoziiert (92).
Infektionen	- Einige epidemiologische Studien und Untersuchungen am Tiermodell deuten auf einen Zusammenhang zwischen KHK und Infektionen durch <i>Chlamydia pneumoniae</i> hin (97).

Tabelle 2 Genetisch bedingte und durch die Umwelt induzierte Risikofaktoren für Atherosklerose und koronare Herzkrankheit (KHK) (1)

2.3.3 Die zellulären und molekularen Aspekte der Atherosklerose

2.3.3.1 Allgemeines

Durch intensive Forschung in den letzten 100 Jahren konnten wichtige Einblicke in die Pathogenese der Atherosklerose gewonnen werden. Dabei wurde die Atherosklerose, welche ursprünglich als eine Störung von Lipidablagerungen definiert wurde, umdefiniert in eine Krankheit, die primär durch das Voranschreiten inflammatorischer Prozesse in den arteriellen Gefäßen charakterisiert ist (1, 2, 5, 6, 106). Besonders durch die Fortschritte bei der Entwicklung spezieller Mausmodelle, welche defizient für definierte Gene sind, haben wir heute ein sehr viel genaueres Bild über die molekularen Vorgänge, welche bei der Bildung atherosklerotischer Läsionen von Bedeutung sind. Obwohl normale Labormäuse keine Atherosklerose entwickeln, kann die Entstehung von Atherosklerose in Apolipoprotein E (ApoE)- oder LDL Rezeptor (LDL-R) –defizienten Mäusen bei gleichzeitiger Fütterung fettreicher Nahrung induziert werden. Unter Zuhilfenahme dieser Mäuse konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, welche die Entwicklung von Atherosklerose vor dem Hintergrund einer Hypercholesterinämie hervorrufen. Unser gegenwärtiges

Verständnis vom Entstehen und Fortschreiten der Atherosklerose ist daher eine Kombination von Erkenntnissen aus Tierversuchen, Zellkultur, der Analyse humaner Läsionen, Untersuchungen an Patienten mit koronaren Syndromen und Populationsstudien zur koronaren Herzkrankheit.

2.3.3.2 *Die Entstehung von Läsionen*

Bei der Entstehung von Läsionen kommt dem Endothel, dass mit seinen „tight junctions“ eine Barriere zwischen Blutstrom und Gewebe bildet, eine besondere Bedeutung zu. Endotheliale Zellen können als Sensoren agieren und bei Bedarf Botenstoffe freisetzen, welche den Umbau des Endothels oder die Entstehung von Entzündungsreaktionen vermitteln können. Das Entfernen von Endothelzellen führt zum Einwandern und anschließender Proliferation von SMC, welche sich absenken nachdem sich das Endothel regeneriert hat (107). Scherkräfte, die aufgrund des Blutflusses auf endotheliale Zellen wirken, haben Auswirkungen auf deren Morphologie. So zeigen Endothelzellen, welche sich in tubulären Abschnitten der Gefäße mit einheitlicher und laminarer Blutströmung befinden, eine ellipsoide Form und sind linear zum Blutfluss ausgerichtet. Zellen, die sich an Arterienverzweigungen und Arterienbögen befinden, an denen der Blutfluss gestört ist, zeigen hingegen eine polygonale Form und keine erkennbare Orientierung. Diese Stellen sind weiterhin durch eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle, wie das Low Density Lipoprotein (LDL), gekennzeichnet und bevorzugte Stellen für die Entstehung von Atheromen (107).

Eine aktuelle Hypothese geht davon aus, dass die Akkumulation von LDL in der subendothelialen Matrix den Startpunkt für die Initiation der Atherosklerose darstellt. Dabei ist die Menge des subendothelial akkumulierenden LDLs proportional zu dessen Serumkonzentration und hängt weiterhin von der Transport- und Verweilzeit des LDLs im Blut ab. Beim Eintritt des LDLs in den Subendothelialraum handelt es sich vermutlich um einen passiven Transportprozess durch die „junctions“ der endothelialen Zellen. Bei diesem Vorgang konnte eine Interaktion zwischen dem LDL-Bestandteil Apolipoprotein B (ApoB) und Matrix-Proteoglycanen nachgewiesen werden (108). Dies erklärt warum auch andere ApoB enthaltende Lipoproteine wie beispielsweise Lp(a), ein Partikel bestehend aus LDL und einem zusätzlichen Apolipoprotein, Apolipoprotein A (ApoA), in der Intima akkumulieren und Atherosklerose induzieren können (1).

Thrombozyten sind die ersten Blutzellen, welche nach der Aktivierung des Endothels in Erscheinung treten. Durch ihre Glykoproteine Ib und IIb/IIIa interagieren sie mit der Oberfläche des Endothels und tragen dadurch zu dessen Aktivierung bei. Eine Inhibierung der Thrombozyten-Adhäsion führt zu einer Reduktion der Leukozyteninfiltration und reduzierter Bildung von Atherosklerose in Mäusen mit Hypercholesterinämie (109).

Aufgrund von Zellkulturexperimenten wird angenommen, dass die Aufnahme von nativem LDL (nLDL) durch Makrophagen nicht ausreicht, um diese zu Schaumzellen werden zu lassen. Deshalb geht eine gängige Hypothese davon aus, dass Schaumzellen vor allem LDL aufnehmen, welches vorher innerhalb der Gefäßwand modifiziert wurde (110). Spätere Untersuchungen konnten nachweisen, dass LDL,

welches in der subendothelialen Matrix zurückgehalten wird, tatsächlich modifiziert wird. Die verschiedenen Modifikationen wie beispielsweise Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation des LDL sind an der Entstehung von Entzündungsherden sowie der Schaumzellbildung beteiligt (111).

Neue Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine Schaumzellbildung auch durch die Aufnahme von nativen LDL über den Prozess der Makropinozytose vermittelt werden kann (112).

Das High Density Lipoprotein (HDL) hat einen stark schützenden Effekt auf die Entwicklung von Atherosklerose, da es den Abtransport von überschüssigem Cholesterin aus dem peripheren Gewebe vermittelt. Ein weiterer schützender Effekt beruht auf seiner Fähigkeit, die Oxidation von Lipoproteinen zu verhindern. Diese Wirkung geht zum Teil auf die Serum-Paraoxonase zurück, einer Esterase, welche zusammen mit dem HDL transportiert wird und die Degradation biologisch aktiver Phospholipide vermittelt (113, 114).

2.3.3.3 *Die Interaktionen zwischen Endothel und Leukozyten*

Atherosklerose ist auch charakterisiert durch die Interaktion von Monozyten und Lymphozyten mit der arteriellen Zellwand. Das initiiierende Ereignis dieser Rekrutierung ist die Stimulation endothelialer Zellen durch oxidiertes LDL (oxLDL), woraufhin diese verschiedene proinflammatorische Proteine wie Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren oder Chemokine bilden (1). Es konnte gezeigt werden, dass ein genetisches Ausschalten oder die pharmakologische Blockade verschiedener Chemokine und Adhäsionsproteine bei mononuklearen Blutzellen in Mäusen die Bildung von Atherosklerose verhindern kann (115-119). Der erste Schritt bei der Adhäsion von Leukozyten, dem so genannten „rolling“ entlang der endothelialen Oberfläche, wird durch Selektine vermittelt, welche an Kohlehydratligenanden auf der Zelloberfläche der Leukozyten binden. Studien in Mäusen, die defizient für E-, P-Selektin oder dem Adhäsionsmolekül „intracellular adhesion molecule 1“ (ICAM1) sind, unterstreichen die Rolle dieser Moleküle in der Entwicklung der Atherosklerose (120, 121). Eine starke Adhäsion von Monozyten und T-Zellen zum Endothel wird zudem durch die Integrine alpha 4 (ITGA4) und beta 1 (ITGB1) auf der Oberfläche der Leukozyten, dem „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) und „component segment 1“ CS-1 auf der endothelialen Zelloberfläche vermittelt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien belegen, dass diese Interaktion bei der Entwicklung von Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt (122, 123). Studien in ApoE^{-/-} Mäusen konnten nachweisen, dass für die Rekrutierung von Monozyten ferner die Interaktion zwischen MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) und CCR2 wichtig ist (115, 116). Hierbei wird MCP-1 von Endothelzellen ausgeschüttet, bindet an CCR2 auf Monozyten und wirkt auf diese Weise chemotaktisch. Ein weiteres wichtiges Molekül in diesem Zusammenhang ist der makrophagenspezifische Colony Stimulating Factor 1 (CSF1), welcher die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen induziert. CSF1 führt in Monozyten zusätzlich zur Expression von Scavengerrezeptoren, welche im folgenden Kapitel genauer besprochen werden. In Mäusen mit einer spontanen Deletion von CSF1 wurde eine dramatische Reduktion der Läsionen beobachtet, wodurch eine obligate Rolle für Makrophagen in der Formierung von atherosklerotischen Plaques suggeriert wird (124). In der kürzlich erschienenen Arbeit von *Swirski et al.* konnte in apoE^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass die kontinuierliche Ansammlung von Monozyten an den Stellen der

Plaqueentstehung proportional mit der Läsionsgröße zunimmt und dass diese Akkumulation durch eine Hypercholesterinämie zusätzlich verstärkt wird (125).

2.3.3.4 Die Rolle von T-Zellen und deren Aktivierung bei der Plaueentstehung

Immunzellen, wie T-Zellen, antigen-präsentierende dendritische Zellen, Monozyten und Mastzellen patrouillieren durch verschiedene Gewebe inklusive der Arterien auf der Suche nach Antigenen (6, 126). Humane atherosklerotische Plaques bestehen zum größten Teil aus V-SMC und zu etwa 40% aus Makrophagen und 10% CD3⁺ T-Zellen (127). Bei der Plaueentstehung werden T-Zellen durch spezifische Chemokine wie CCL5 (auch RANTES), CXC-Chemokin Ligand 10 (CXCL10) oder CXCL11 rekrutiert (116). Dabei sind es vor allem CD4⁺ T-Zellen, welche an Major Histocompatibility Complex II (MHCII) gebundene Antigene erkennen. Aus humanen Läsionen konnten T-Zellen kloniert werden, welche reaktiv gegen oxLDL, heat shock protein 60 und Chlamydien waren (128-130). Zusätzlich konnten Zytokine in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden, welche zur Aktivierung von T_H1 T-Zellen und dadurch zur nachfolgenden Aktivierung von Makrophagen durch ausgeschüttetes Interferon γ (INF γ) führen (131-133). INF γ steigert die Effizienz der Antikörper-Erkennung und erhöht die Synthese des „tumor necrosis factor α “ (TNF α) und Interleukin 1 β (IL1 β). Beide regen synergistisch die Produktion weiterer inflammatorischer und zytotoxischer Moleküle in Makrophagen und benachbarten vaskulären Zellen an (6). Dass diese Prozesse bei der Entstehung der Atherosklerose von Bedeutung sind, konnte in apoE^{-/-} Mäusen demonstriert werden, wo das Ausschalten von INF γ oder dem INF γ -Rezeptor in einer Reduktion der Atherosklerose resultierte (134, 135). Neben INF γ produzierenden Zellen befinden sich in solchen Läsionen aber auch Interleukin 12- (IL12), IL15-, IL18- und TNF-seziernde T-Zellen, jedoch kaum Zellen, welche das T_H2 Zytokin IL-4 produzieren (129, 131, 133). Diese Vorherrschaft von T_H1-spezifischen Zytokinen deutet darauf hin, dass überwiegend T_H1 Zellen an der Entstehung von Läsionen beteiligt sind. Diese Hypothese wird durch Studien in Mäusen mit Hypercholesterinämie unterstützt, in denen eine Ausschaltung von INF γ oder des INF γ -Rezeptors, aber auch von IL12, IL18, TNF oder des T_H1-induzierenden Transkriptionsfaktors T-bet zu einer Reduktion der atherosklerotischen Plaques führte (134, 136-139). Des weiteren führen die systemische Applikation rekombinanten INF γ oder der T_H1-Zell-inhibierenden Substanz Pentoxifyllin in Mäusen mit Hypercholesterinämie zu einer Vergrößerung bzw. Verkleinerung der atherosklerotischen Läsionen, was die Hypothese einer T_H1-gesteuerten Progression der Atherosklerose weiter unterstützt (140, 141). Bei der Entwicklung der Atherosklerose spielen auch T_H2 Zellen eine Rolle, indem sie sowohl proatherogene als auch antiatherogene Effekte vermitteln. Ein proatherogener Effekt, welcher von T_H2 Zellen vermittelt wird, ist der Beitrag zur Formierung von Aneurismen durch Induktion elastolytischer Enzyme (142).

Weiterhin sind bei der Entstehung früher Läsionen „Natural Killer“ (NK) Zellen von Bedeutung, da sie Lipidantigene erkennen können und ihre Aktivierung in apoE^{-/-} Mäusen zu einer Steigerung der Atherosklerose führt (143). CD8⁺ T-Zellen, welche vor allem virale Antigene erkennen, sind ebenfalls in Läsionen zu finden. In apoE^{-/-} Mäusen führt die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zum Untergang arterieller Zellen und einer Beschleunigung des Voranschreitens der Atherosklerose (144). Obwohl alle T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenspezifität an atherosklerotische Plaques rekrutiert werden können, besteht die Mehrzahl dieser T-Zellen aus der heterogenen

Gruppe der CD45RO⁺ Memory T-Zellen, die sich im Ruhezustand befinden (145, 146). Eine aktuelle Theorie geht davon aus, dass diese Zellen, welche durch vorangegangene Infektionen und andere fremde Antigene entstanden sind, innerhalb der Plaques sehr rasch proliferieren können, nachdem sie dem gleichen oder einem ähnlichen Pathogen ausgesetzt wurden. Diese, durch antigen-präsentierende Zellen induzierte Proliferation, führt dann zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, Koagulationsfaktoren und Matrixmetalloproteasen (MMPs), welche das Aufbrechen des Plaques zur Folge haben können (147).

2.3.3.5 Die Rolle der Monozyten bei der Plaqueentstehung

2.3.3.5.1 Die Modifikationen von LDL

Untersuchungen zur Schaumzellbildung offenbarten, dass eine Modifikation von LDL und die anschließende Aufnahme dieses modifizierten LDLs durch Makrophagen, die Bildung von Schaumzellen induziert (148). Weiterhin haben Beobachtungen im Tiermodell gezeigt, dass oxLDL eine chemoattraktive Wirkung auf Monozyten und T-Zellen hat und seinerseits die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert. Zusätzlich führt es zur Auto-Antikörperbildung und der Aktivierung von T-Zellen (105). An der Modifikation von LDL sind neben reaktiven Sauerstoffformen (Reactive Oxygen Species, ROS), auch verschiedene Enzyme wie beispielsweise die Myeloperoxidase (MPO), die Sphingomyelinase (SMase) oder die sekretorische Phospholipase (sPLA₂) beteiligt, welche in humanen atherosklerotischen Läsionen vorkommen. Die Myeloperoxidase generiert hochreaktive Moleküle, wie Hypochlorsäure oder Tyrosyl-Radikale, welche beide LDL modifizieren können, das später durch Scavengerrezeptoren aufgenommen werden kann (149). Der Sphingomyelinase wird eine Beteiligung an der Aggregation von LDL und dessen nachfolgender verstärkter Aufnahme durch Makrophagen zugeschrieben (150). Die sekretorische Phospholipase ist in der Lage, die Oxidation von LDL zu vermitteln. Studien in Mäusen, welche dieses Enzym überexprimieren, weisen daher eine deutlich verstärkte Form der Atherosklerose auf (151). Eine weitere Quelle für die Bildung von ROS ist die 12/15-Lipoxygenase. Lipoxygenasen vermitteln den Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren und produzieren dadurch Moleküle wie HPETE (Hydroperoxyeicosatetranoic Acid), welche durch die Zellmembran transportiert werden können und so zur Modifikation von LDL beitragen. Bei Untersuchungen an 12/15-Lipoxygenase knockout Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass dieses Enzym an der Bildung von Atherosklerose beteiligt ist (152). Zahlreiche weitere Studien unterstützen eine Beteiligung von oxLDL an der Bildung der Atherosklerose. Makrophagen nehmen beispielsweise bevorzugt oxLDL auf, was zu einer verstärkten Schaumzellbildung führt und aufgrund der Zytotoxizität von oxLDL Apoptose induzieren kann (153).

2.3.3.5.2 Die Scavenger Rezeptoren

In den letzten Jahren waren Scavenger Rezeptoren Gegenstand intensiver Untersuchungen. Ihre Entdeckung erklärte die exzessive Aufnahme von Lipiden und Cholesterin durch Macrophagen, die zur Bildung der Schaumzellen führt. Der Name „Scavenger“ (engl. „Aasfresser“) Rezeptor erklärt sich aus deren Fähigkeit, eine große Anzahl verschiedener Liganden zu binden und zu entsorgen. Dem Vorschlag von Krieger (154) folgend, sind diese in 10 Klassen (Klasse A – J) aufgeteilt.

Mitglieder der Klassen A, B, D, E, F, G und H wurden innerhalb atherosklerotischer Plaques nachgewiesen und werden derzeit im Zusammenhang mit der Bildung von Schaumzellen diskutiert (155). Im Folgenden soll nur auf die wichtigsten Vertreter der Klassen A, B, D und H eingegangen werden.

2.3.3.5.2.1 Die Klasse A Scavenger Rezeptoren

Die zur Klasse A gehörenden Scavenger Rezeptoren SR-AI, SR-AII und SR-AIII sind alle Produkte eines Gens, die durch alternatives Splicing entstehen. SR-AIII wird aufgrund seiner unterschiedlichen intrazellulären Modifikationen nicht an der Zelloberfläche präsentiert, die Expression einer löslichen Form von SR-AIII führt jedoch zu einer Inhibierung der Ligandenbindung an SR-AI und SR-AII in Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen (155). SR-AI und II werden von Gewebe-Makrophagen (z.B. Kupfer Zellen) und endothelialen Zellen innerhalb der Aorta und der Leber, exprimiert (156, 157). Eine verstärkte Expression von SR-AI und II wurde zudem in Makrophagen innerhalb atherosklerotischer Plaques nachgewiesen (156, 158). Hier wird die Expression von SR-AI und II noch zusätzlich durch seinen Liganden oxLDL verstärkt (159).

Die Rolle von SR-A bei der Formierung der Atherosklerose in Mäusen wurde in verschiedenen Studien untersucht. So zeigten ApoE^{-/-}/SR-A^{-/-}, welche mit einer fett- und cholesterinarmen Nahrung gefüttert wurden, nach 4 Wochen eine 60%ige Reduktion der atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu apoE^{-/-} knockout Mäusen (160). In einer folgenden Studie von *Sakaguchi et al.* (161) wurden SR-A^{-/-} knockout Mäuse mit LDL-R^{-/-} Mäusen gekreuzt und mit einer fettreichen Diät aufgezogen. Nach 4 Wochen zeigten diese LDLR^{-/-}/SR-A^{-/-} Mäuse eine 28%ige Reduktion und nach 12 Wochen eine 23%ige Reduktion der atherosklerotischen Läsionen, verglichen mit den LDL-R^{-/-} Mäusen (161). Schaumzellen innerhalb der Läsionen zeigten keine Expression des LDL-R oder von SR-A, jedoch eine deutlich erhöhte Expression weiterer Scavenger Rezeptoren wie MARCO, CD36 oder CD68 (161). Obwohl beide Studien einen proatherogenen Effekt von SR-A vermuten lassen, konnte in der Studie von *de Winther et al* (162) dieser Effekt nicht bestätigt werden. Hier wurden SR-A^{-/-} Mäuse mit apoE3-Leiden Mäusen gekreuzt und für 10 Wochen mit einer fettreichen Diät gehalten. In dieser Studie konnten keine signifikanten Änderungen der Läsionen durch Ausschalten von SR-A I belegt werden. Bei zusätzlicher Fütterung mit 0,5% Cholsäure, einer in der Leber aus Cholesterin gebildeten Gallensäure, wurde eine signifikante Vergrößerung der atherosklerotischen Läsionen festgestellt (162). Durch Knochenmarktransplantationen wurden in weiteren Untersuchungen C57Bl/6-SR-A^{-/-} und C57Bl/6-LDLR^{-/-}/SR-A^{-/-} Mäuse geschaffen. In beiden Maustypen hatte das Ausschalten von SR-A eine 60%ige Reduktion der atherosklerotischen Läsionen zur Folge. Damit wurde zumindest in der Anfangsphase der Formierung atherosklerotischer Plaques, eine proatherogene Wirkung von SR-A untermauert (163).

2.3.3.5.2.2 Die Klasse B Scavenger Rezeptoren

SR-BI und CD36 bilden zusammen die Klasse B der Scavenger Rezeptoren. Für den SR-BI Rezeptor konnte gezeigt werden, dass er als Rezeptor für HDL fungiert und die selektive Aufnahme von Cholesterinestern aus HDL vermittelt (164). Durch

Untersuchungen an apoE^{-/-} Mäusen wurde zudem seine Anwesenheit in den Verdickungen der Intima dieser Mäuse festgestellt, was zu Überlegungen einer möglichen proatherogenen Wirkung von SR-BI führte (165). Es konnte daraufhin nachgewiesen werden, dass SR-BI in der Lage ist, auch modifizierte Lipoproteine, anionische Phospholipide und apoptotische Zellen zu binden (166). In SR-BI^{-/-} und SR-BI^{-/-}/LDLR^{-/-} Mäusen konnte schließlich eine antiatherogene Wirkung von SR-BI belegt werden. Beide Maustypen wiesen eine erhöhte Plaquebildung im Vergleich zu ihrem Wildtyp auf (167, 168). Durch eine Rückkreuzung in apoE^{-/-} Mäuse führte die Defizienz in SR-BI aber zu kardialer Dysfunktion und vorzeitigem Tod (169, 170). Untersuchungen an LDL-R^{-/-} Mäusen mit fortgeschrittenen Läsionen demonstrierten, dass SR-BI in Makrophagen zu einer Reduktion der Atherome führt (168, 171). Im Gegensatz dazu, wurde die Bildung von „fatty streaks“ durch SR-BI in LDL-R^{-/-} Mäusen verstärkt (171). Dies verdeutlicht die duale Rolle von SR-BI in Abhängigkeit vom Pathogenese-Stadium der Atherosklerose.

CD36 wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen exprimiert, unter anderem in Endothelialzellen, Adipozyten, Erythrozyten-Vorläuferzellen, Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen (155). Untersuchungen im Mausmodell zeigten, dass CD36 eine Funktion bei der Bindung und Internalisierung modifizierten LDLs besitzt (172). CD36-defiziente Maus-Makrophagen weisen in dieser Studie eine 60-80%ige Reduktion der oxLDL Aufnahme auf (172). Ein atherosklerotischer Effekt für CD36 konnte zudem in apoE^{-/-}/CD36^{-/-} Mäusen demonstriert werden. Diese Tiere weisen, verglichen mit apoE^{-/-} Tieren, eine bis zu 70%ige Reduktion der atherosklerotischen Läsionen auf (173-175).

2.3.3.5.2.3 Die Klasse D Scavenger Rezeptoren

CD68 ist der einzige Angehörige der Klasse D. Dieser Rezeptor wird vor allem in Makrophagen exprimiert und ist in der Lage, oxLDL spezifisch zu binden (159). Der Großteil dieses hochglykosylierten Proteins kommt im Endosom und Lysosom des Makrophagen vor und wird daher als Marker für diesen Zelltyp benutzt.. Weiterhin weisen Dendritische Zellen eine Expression von CD68 auf (176, 177). Ein geringer Anteil von CD68 wird auch auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Zelloberflächenpräsentation von CD68 wird unter anderem durch oxLDL induziert (159). Eine funktionelle Relevanz von CD68 für die Scavenger Rezeptor-vermittelte Bildung von Schaumzellen ist nicht belegt.

2.3.3.5.2.4 Die Klasse H Scavenger Rezeptoren

Die Klasse H der Scavenger Rezeptoren wird durch die sehr großen Membranproteine Stabilin-1 (STAB1 oder FEEL1) und Stabilin-2 (STAB2 oder FEEL2) gebildet. Beide sind zu 39,8% identisch und binden neben Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien auch acyliertes LDL (178, 179). Eine mögliche funktionelle Rolle von STAB1 und 2 als Scavenger Rezeptor wird derzeit untersucht. Es scheint jedoch klar, dass STAB1 die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen vermitteln und somit auch an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligt sein kann (180).

2.3.3.5.3 Die Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren binden neben bakteriellen Pathogenen auch pathogen-ähnliche Moleküle, wie beispielsweise oxLDL. Im Gegensatz zu Scavengerrezeptoren initiieren sie jedoch Signalkaskaden, welche zur Zellaktivierung führen (181). So produzieren zum Beispiel aktivierte Makrophagen inflammatorische Zytokine, Proteasen und zytotoxische Sauerstoff- und Stickstoff-Radikale. Ähnliche Effekte wurden in dendritischen Zellen, Mastzellen und endothelialen Zellen beobachtet, welche ebenfalls Toll-like Rezeptoren exprimieren (181). Zellen innerhalb atherosklerotischer Läsionen exprimieren ein ganzes Spektrum an Toll-like Rezeptoren. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Rezeptoren auch an Entzündungsreaktionen innerhalb dieser Läsionen beteiligt sind (2, 146). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass das Ausschalten von MyD88, einem wichtigen Vermittlerprotein innerhalb der Signalkaskade von Toll-like Rezeptoren, in apoE^{-/-} knockout Mäusen zu einer Reduktion der Atherosklerose führt (182).

Eine kurze Zusammenfassung der molekularen und zellulären Prozesse, welche bei der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen von Bedeutung sind, gibt die Abbildung 2-5.

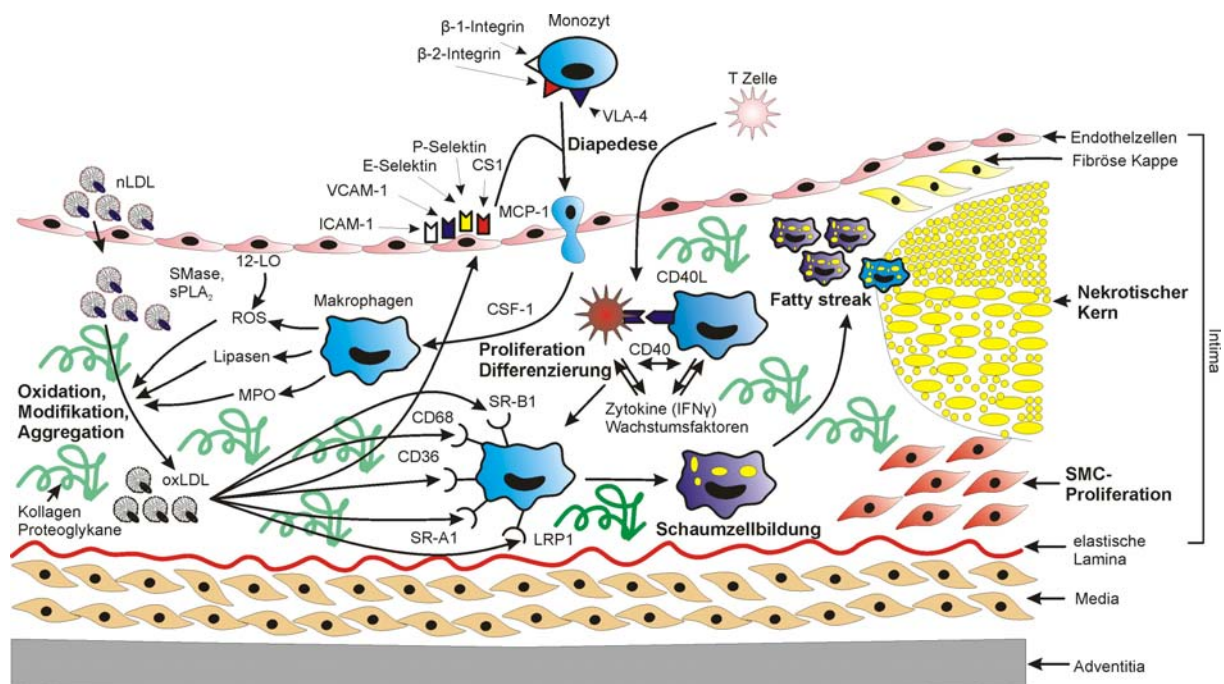


Abbildung 2-5 Zusammenfassung einiger zellulärer Prozesse, die an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt sind

2.3.3.6 Fortgeschrittene Läsionen und Thrombose

Beim Voranschreiten der Plaqueentwicklung spielt die Interaktion unterschiedlicher Zelltypen über Oberflächenproteine eine wichtige Rolle. Zwei Zelloberflächenproteine, CD40 und sein Ligand CD40L, sind dabei von besonderer Bedeutung, da sie Ähnlichkeiten mit löslichen proinflammatorischen Zytokinen haben und zur Ausschüttung weiterer inflammatorischer Zytokine, zur Sekretion von Matrixmetalloproteinasen, sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen beitragen (183). Im Gegensatz zu Zytokinen haben sie zusätzlich eine gerinnungsfördernde

Wirkung. Beide Proteine werden in Makrophagen, T-Zellen, V-SMCs und Thrombozyten exprimiert und ihre Inhibierung führt zu einer Reduktion der Atherosklerose im Tiermodell (184, 185).

Pathologische Studien zeigen, dass das Entstehen von Thrombus-induzierten akuten koronaren Verstopfungen im Wesentlichen von der Zusammensetzung und Stabilität der Plaques abhängt und weniger vom Schweregrad der Stenosen (1, 186). Instabile Plaques, welche aufbrechen und einen Thrombus freisetzen können, machen etwa 60-70% aller koronaren Thrombosen aus. Der restliche Anteil entsteht aufgrund endothelialer Erosion (187). Aufbrechende Plaques haben in der Regel eine dünne fibröse Kappe und enthalten eine erhöhte Anzahl aktivierter Leukozyten. Neben Dendritischen Zellen (DC), Mastzellen, einigen B-Zellen und NK T-Zellen sind es vor allem Makrophagen und T-Zellen, welche maßgeblich zur Instabilität der Plaques beitragen (127, 188, 189) (Abbildung 2-6).

Eine Vielzahl unterschiedlicher Botenstoffe und Enzyme tragen ebenfalls zur Plaqueinstabilität bei. So produzieren T-Zellen beispielsweise $\text{INF}\gamma$, welches die Matrixproduktion durch SMC inhibiert. Makrophagen degradieren die extrazelluläre Matrix zusätzlich durch Sekretion verschiedener Enzyme. Dabei spielen zwei Arten von Proteasen eine wichtige Rolle: Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Cystein-Proteasen (190, 191). Einige wichtige Vertreter der MMPs in atherosklerotischen Plaques sind Gelatinase-A (MMP2), Stromelysin (MMP3) und Gelatinase-B (MMP9) (4). Ihre Aktivität wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Inflammatorische Zytokine induzieren ihre Expression, Plasmin aktiviert ihre unreifen Vorläuferformen durch proteolytische Spaltung und verschiedene Inhibitorproteine können ihre Aktivität unterbinden. In gleicher Weise werden Cystein-Proteasen durch Zytokine induziert und durch Inhibitoren, die Cystatine, inhibiert (191). Der Aufbruch der Plaques erfolgt meistens an den Schultern, wo sich eine Vielzahl von Schaumzellen befindet. Dies zeigt, dass Faktoren, welche zu Entzündungsreaktionen führen, ebenfalls zur Thrombusbildung beitragen. Weiterhin gibt es eine Häufung von Herzinfarkten und Schlaganfällen im Zusammenhang mit Infektionen (1). Die Stabilität von Plaques wird zudem durch Prozesse wie Verkalkung und dem Einwachsen neuer Blutgefäße in den Plaque bestimmt (192)

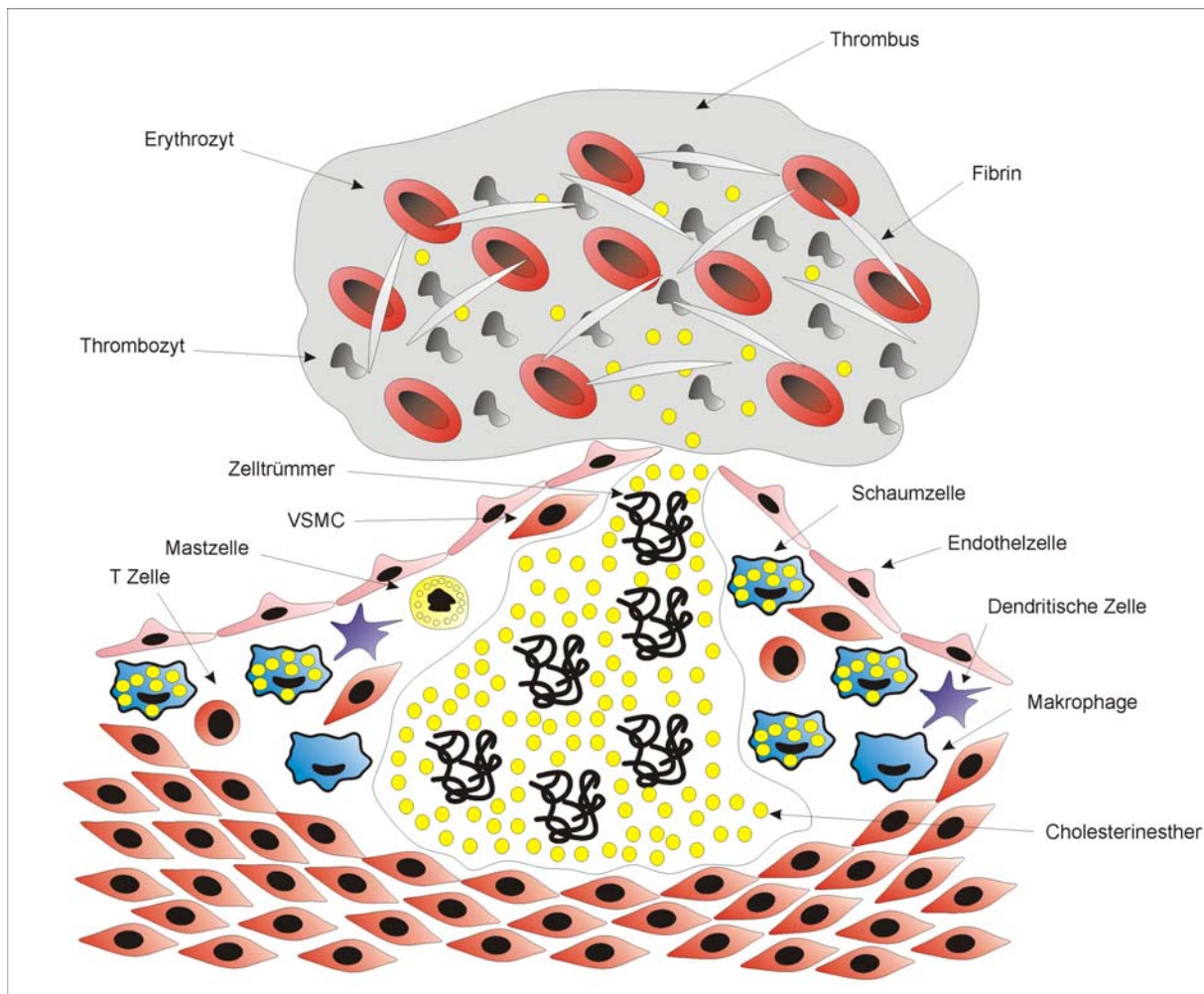


Abbildung 2-6 Thrombusbildung durch das Aufreißen der fibrösen Plaquekappe

2.4 Genetische Krankheiten und Atherosklerose

Obwohl in den meisten Fällen die Entstehung von Atherosklerose durch das Zusammenspiel mehrerer unterschiedlicher Faktoren zustande kommt, sind die wichtigsten Einblicke in die Entstehung der Atherosklerose durch Studien an seltenen, vererblichen Krankheiten gewonnen wurden (Tabelle 3).

Merkmale	Krankheit (Gen)	Charakteristika
erhöhte LDL/VLDL Serumwerte	Familiäre Hypercholesterinämie (LDL-Rezeptor) (193)	- Dominante Krankheit, welche durch sehr hohe LDL- und Cholesterinwerte charakterisiert ist; führt bereits in der Kindheit zu schwerer KHK.
	Familiär defektes ApoB100 (apoB)	- Dominante Krankheit, LDL Bindung an den LDLR ist gestört, der Schweregrad ist nicht so hoch wie bei der Familiären Hypercholesterinämie.
niedrige HDL Serumwerte	ApoA1 Defizienz (apoA1)	- Bei der homozygoten Form existiert praktisch kein HDL, was zu sehr früher Entwicklung von KHK führt
	Tangier Disease (194-196)	- Diese rezessive Funktionsstörung beruht auf dem Defekt des ABCA1 Transporters. Die Zellen sind nicht mehr in der Lage Cholesterin und Phospholipide zu exportieren, was zu einem sehr niedrigen HDL –Spiegel im Blut führt.
	LCAT Defizienz	- Sehr niedrige HDL-Konzentrationen aufgrund des

		Fehlens von Cholesterinestern in den HDL
erhöhtes Homozystein	Homozystinurie (Cystathionine- β -synthetase)	- Rezessive Stoffwechselstörung, welche durch erhöhte Werte an Homozystein charakterisiert ist und zu verschiedenen okklusiven Gefäßkrankheiten führt.
Diabetes mellitus Typ 2	MODY1 (hepatocyte nuclear factor 4 α), MODY2 (Glucokinase), MODY3 (hepatocyte nuclear factor 1 α) (197)	- MODY (maturity-onset diabetes of the young) 1, 2 und 3 sind charakterisiert durch eine nicht-Insulin abhängige Entwicklung von Diabetes mellitus in jungen Erwachsenen.
Bluthochdruck	Glucokortikoid-sensibler Aldosteronismus (Hybridgen durch „crossover“ der 11- β -Hydroxylase und der Aldosteronsynthase) (96)	- Dominante Störung mit früh einsetzendem Bluthochdruck und Schlaganfall.
	Liddle-Syndrom (epithelialer Natrium-Kanal) (96)	- Dominante Störung mit Bluthochdruck und stoffwechselbedingter Alkalämie.
	Mineralkortikoid Rezeptor (198)	- Bluthochdruck in Zusammenhang mit Schwangerschaft.

Tabelle 3 Beispiele für vererbliche Krankheiten, die mit Atherosklerose assoziiert sind (1)

Durch Untersuchungen an Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie wurden Regulationsnetzwerke entdeckt, welche später zu Zielen cholesterinsenkender Pharmaka wurden. Eine weitere erblich bedingte Krankheit, welche zur Entwicklung von Atherosklerose führt, ist die Tangier Disease. Patienten mit dieser Krankheit besitzen praktisch kein HDL aufgrund einer Mutation im ATP-binding cassette (ABC) transporter 1 (ABCA1) (194-196). Dieser Fakt macht die Krankheit zu einem interessanten Model für die Untersuchung der Atheroskleroseentwicklung.

Im Gegensatz zu den oben genannten Krankheiten war der Erfolg bei der Untersuchung der Entstehung und des Ablaufs der Atherosklerose, die eine komplexe Genese haben, bisher eher gering. Eine Reihe von Studien konnten zwar verschiedene Gene identifizieren, die auf unterschiedliche Weise an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind, jedoch ist das Verständnis über deren Zusammenwirken noch unvollständig. Einige dieser Gene, deren genetische Varianten zur Entstehung der Atherosklerose beitragen, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

beeinflusster Parameter	Polymorphismus in Gen	Variation
LDL/VLDL	ApoE (199)	- Drei häufige Allele bekannt. Erhöhte Cholesterinwerte beim E4-Allel durch gestörte Aufnahme von Chylomikronen und VLDL durch die Leber.
HDL	hepatische Lipase (200)	- Promotor-Polymorphismus führt zu niedrigem HDL Spiegel.

	ApoAI-CIII-AIV (200) Cholesterinester- Transfer-Protein (CETP) (201)	<ul style="list-style-type: none"> - Multiple Polymorphismen führen zu niedrigen HDL. - Hohe HDL-Werte die in Kombination mit Polymorphismus der hepatischen Lipase das KHK-Risiko erhöhen.
	Lipoprotein Lipase (201, 202)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Mutation führt zu HDL-Senkung.
Lipoprotein(a)	apo (a) (94)	<ul style="list-style-type: none"> - Multiple Allele von apo (a) erklären 90% der Varianzen der Lp(a) -Plasmakonzentration (95).
Homozystein	Methylentetrahydro- folatreduktase (203)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Polymorphismen erhöhen Homocysteinwerte.
Koagulation	Fibrinogen B (204)	<ul style="list-style-type: none"> - Promotorpolymorphismus ist mit verstärkter Koagulation assoziiert.
	PAI1 (205)	<ul style="list-style-type: none"> - Promotorpolymorphismus ist mit verstärkter Koagulation assoziiert.
Blutdruck	Angiotensinogen (96)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> und Promotor Polymorphismen assoziiert mit Bluthochdruck.
	β 2-adrenerger Rezeptor (96)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Polymorphismus assoziiert mit Bluthochdruck.
	Alpha-aduccin (96)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Polymorphismen assoziiert mit Bluthochdruck.
KHK	Angiotensin converting enzyme (ACE) (206)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Insertion</i> und <i>deletion</i> Mutationen bekannt. Assoziation mit Blutdruckerhöhung und KHK ist umstritten.
	Serum Paraoxonase (113, 114)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Polymorphismen sind assoziiert mit KHK.
	Haemachromatosis associated gene (207)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Polymorphismen sind assoziiert mit KHK
	endotheliale Nitritoxid- Synthase (208)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Polymorphism en sind assoziiert mit KHK.
	Phosphodiesterase 4D (PDE4D) (209)	<ul style="list-style-type: none"> - Drei verschiedene Allele für Wildtyp bekannt. KHK- und Schlaganfallasoziation sind umstritten
	Interleukin 1 Rezeptor (IL1R) (210)	<ul style="list-style-type: none"> - Zwei verschiedene Allele bekannt, eines davon ist mit erhöhtem Risiko für Atherosklerose assoziiert.
	Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) (211)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Missense</i> Polymorphismen sind assoziiert mit KHK

Tabelle 4 Gene, deren Mutationen in Kombination mit anderen Faktoren die Bildung von Atherosklerose begünstigen (1)

2.4.1 Monogen induzierte Hypercholesterinämien

2.4.2 Allgemeines

Wie bereits im vorherigen Abschnitt dargestellt, gibt es eine Vielzahl verschiedener Ursachen für die Entstehung der Atherosklerose. Da die meisten dieser Faktoren additiv wirken, sind Untersuchungen über die Entstehung und das Voranschreiten der Atherosklerose, speziell im Menschen, schwierig. Nicht zuletzt wegen der notwendigen ethischen Schranken, welche bei Untersuchungen am Menschen zu beachten sind, kommen die meisten Erkenntnisse über molekulare Zusammenhänge der Atherosklerose aus dem Tiermodell. Hier nimmt das Mausmodell bei der Untersuchung der Atherosklerose eine herausragende Stellung ein. Da jedoch Wildtyp-Mäuse selbst bei stark cholesterinreicher Nahrung nur sehr selten und auch nur im weit fortgeschrittenen Alter spontan eine Atherosklerose entwickeln, ist es notwendig, für solche Untersuchungen bestimmte Gene, wie die für den LDL-R oder das apoE, auszuschalten. Aufgrund der Unterschiede in der Physiologie zwischen Maus und Mensch ist jedoch eine vollständige Übersetzung solcher Erkenntnisse auf den Menschen nicht immer möglich.

Um genauere Informationen über den Ablauf der Atherosklerose im Menschen zu erhalten, wurden Untersuchungen an Leukozyten von Patienten durchgeführt, welche einen monogenen Defekt als Ursache für die Entstehung von Atherosklerose ausweisen. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie gewählt, welche aufgrund eines Defekts des LDL-R sehr früh eine Atherosklerose entwickeln. In der Regel sind diagnostizierte FH-Patienten aufgrund der Schwere solcher Defekte ärztlich besonders gut kontrolliert und dokumentiert. Dies macht eine spätere Interpretation der Ergebnisse deutlich einfacher, da die Krankheitsgeschichte und Medikamentierung dieser Patienten bekannt sind und bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden können.

2.4.2.1 *Familiäre Hypercholesterinämie*

Die Familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist die am weitesten verbreitete Form einer Hypercholesterinämie, welche durch einen monogenen Erbdefekt verursacht wird. Sie war eine der ersten sowohl klinisch als auch genetisch charakterisierten Lipidstoffwechselerkrankungen (212). Die Verbreitung der heterozygoten Form der FH liegt durchschnittlich bei 1 in 500, die der homozygoten Form bei 1 in 1.000.000. Damit beträgt die Zahl der weltweit homo- bzw. heterozygoten FH Träger etwa 10 Millionen (10).

2.4.2.2 *Das Krankheitsbild*

Die FH wird autosomal kodominant vererbt und wird durch einen Defekt im LDL-R-Gen verursacht. Homozygote Träger zeigen eine stärkere Krankheitsausprägung als heterozygote Träger und haben unabhängig von Ernährung, Lebensführung, Geschlecht und Alter sehr hohe Serum-LDL- und -cholesterinkonzentrationen. So weisen beispielsweise homozygote FH-Patienten in China, wo die Aufnahme von Cholesterin und gesättigten Fettsäuren traditionell sehr niedrig ist, gleiche LDL-Cholesterin-Werte wie homozygote FH-Patienten aus Westeuropa auf, wo relativ hohe Mengen an Cholesterin mit der Nahrung aufgenommen werden (213).

Homozygote FH-Patienten bilden bereits in der Kindheit subkutane Xanthome an den Sehnen. Dabei handelt es sich um Ansammlungen von Schaumzellen, welche unter der Haut vor allem an den Sehnen der Fersen, Ellenbogen und zwischen den Fingern akkumulieren (Abbildung 2-7). Ein weiteres Symptom ist ein grauer Ring unter der Augenhornhaut (Arcus cornealis), welcher durch Einlagerungen fettreicher Partikel entsteht.



Abbildung 2-7 Zwei eineiige Zwillinge türkischer Herkunft im Alter von 3 Jahren, beide sind homozygote FH-Träger. Die Pfeile markieren die deutlich ausgeprägten subkutanen Xanthome. Beide Patienten sind Teil der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Studiengruppe. Mit freundlicher Genehmigung von *Lancet* (214)

Patienten mit homozygoter FH entwickeln aufgrund der stark erhöhten LDL-Serumwerte bereits in der Kindheit Atherosklerose. Dabei steigt die Ausprägung der Atherosklerose proportional zur Menge an Serum-LDL und dessen Verweildauer im Blut an (215). Wird die Menge an Serum-LDL nicht effektiv gesenkt, ist die Lebenserwartung homozygoter Patienten aufgrund von kardiovaskulären Krankheiten gering. Die Optimierung anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie Lebensführung und Ernährung hat wenig Einfluss auf den Verlauf der Krankheit (212). Die Serum-HDL-Werte sind sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten Patienten normal bis leicht erniedrigt.

Patienten mit homozygoter FH können in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1) Patienten, deren LDL-R Aktivität (meist an Fibroblasten gemessen) weniger als 2% der normalen LDL-R Aktivität beträgt (die Rezeptor-negativen Patienten) und 2) Patienten, welche eine Restaktivität von 2-25% der normalen LDL-R Aktivität aufweisen und als Rezeptor-defiziente Patienten bezeichnet werden (212). Unbehandelte Rezeptor-negative Patienten erreichen kaum das Alter von 20 Jahren. Rezeptor-defiziente Patienten haben zwar eine etwas bessere Prognose, entwickeln aber bis auf wenige Ausnahmen klinisch signifikante atherosklerotische Krankheiten im Alter von 30 Jahren und früher (212).

Die Serum-LDL-Cholesterinwerte heterozygoter FH-Patienten sind deutlich niedriger als die der homozygoten Patienten (in der Regel 40-75 % niedriger) und hängen in größerem Umfang von weiteren Risikofaktoren ab. Obwohl die Art des genetischen Defekts einen deutlichen Einfluss auf die Ausprägung der FH hat, können die Serum-LDL-Cholesterin-Werte dieser Patienten stark schwanken. Daher hängt eine

klinische Prognose heterozygoter Patienten von weiteren genetischen Faktoren und deren Lebensführung ab (216).

2.4.2.3 Die Diagnose

Ein großes Problem der FH stellt ihre unzureichende Diagnose in der Bevölkerung dar. So schwankt die Prozenträte diagnostizierter FH-Patienten zwischen 1% in Russland, 20% in den Niederlanden (wo seit 1994 ein Programm zur Diagnose der FH existiert) und 44% in Island mit seiner relativ kleinen Population und guter Patientenüberwachung (10). Für eine definitive Diagnose von FH müssen verschiedene Kriterien erfüllt werden. In den Niederlanden existiert beispielsweise ein Punktesystem, welches für bestimmte Phenotyp-Kriterien unterschiedliche Punktzahlen vergibt. Liegt die Gesamtpunktzahl aller Kriterien bei 8 oder darüber, ist die Diagnose FH sicher (Tabelle 5) (10). Ähnliche Kriterientabellen existieren auch in anderen Ländern.

Familiäre Geschichte	Punktzahl
bei Angehörigen ersten Grades (Männer < 55 Jahren, Frauen < 60 Jahren) liegt eine KHK vor	1
Angehörige ersten Grades haben ein LDL-Cholesterin Wert über dem 95. Perzentil ODER Sehnen-Xanthome und/oder Arcus cornealis	2
Kinder unter 18 Jahren haben ein LDL-Cholesterin Wert über dem 95. Perzentil	2
Klinische Geschichte	
Vorliegen einer KHK (Männer < 55 Jahren, Frauen < 60 Jahren)	2
Vorliegen peripherer oder cerebraler Gefäßkrankheiten (Männer < 55 Jahren, Frauen < 60 Jahren)	1
physische Symptome	
Sehnen-Xanthome	6
Arcus cornealis < 45 Jahren	4
Laboranalysen	
LDL-Cholesterin > 8,5 mmol/l (> 330 mg/dl)	8
LDL-Cholesterin 6,5 – 8,4mmol/l (250 – 329mg/dl)	5
LDL-Cholesterin 5,0 – 6,4mmol/l (190 – 249mg/dl)	3
LDL-Cholesterin 4,0 – 4,9mmol/l (155 – 198mg/dl)	1
DNA Analyse	
Funktionelle Mutation im LDL-R	8

Tabelle 5 Punktesystem zur Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie nach den Kriterien des „Dutch Lipid Network“, Pro Kriterium werden Punkte verteilt und anschließend zusammengerechnet. Werden insgesamt 8 oder mehr Punkte erreicht, gilt die Diagnose der FH als sicher.

2.4.2.4 Die Behandlung

Heterozygote FH-Patienten werden in aller Regel mit Statinen behandelt. Dies sind Medikamente, welche die HMG-CoA-Reduktase (HMGCR), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterin-Biosynthese, inhibieren und dadurch die Heraufregulation der LDL-R-Expression induzieren. Um die gewünschten LDL-Cholesterin-Werte zu erreichen, ist oft die Kombination mit weiteren Medikamenten, wie beispielsweise Ezetimibe notwendig. Ezetimibe inhibiert spezifisch die Cholesterin-Resorption im Darm und führt somit in Kombination mit der Inhibition der endogenen Cholesterinsynthese zu einer deutlichen Senkung des LDL-Cholesterin-Werts (217, 218).

In homozygoten FH-Patienten haben Statine und Ezetimibe nur einen moderaten Effekt. Obwohl sich bei einigen homozygoten Rezeptor-defekten Patienten mit Medikamenten die LDL-Cholesterin-Werte etwas senken lassen, ist eine alleinige medikamentöse Behandlung dieser Patienten nicht ausreichend. Die zum jetzigen Zeitpunkt am besten geeignete Methode zur Behandlung homozygoter FH-Patienten stellt die LDL-Apherese dar. Diese Behandlung erlaubt das selektive Entfernen von LDL aus der Zirkulation durch extrakorporale Bindung von LDL an Dextransulfat-, Heparin- oder anti-apoB-Antikörper-Säulen. Obwohl diese Behandlungsmethode sehr zeit- und kostenaufwendig ist, stellt sie derzeit die einzige verfügbare Behandlungsstrategie dar, welche in der Lage ist, das Voranschreiten der Atherosklerose in homozygoten FH-Patienten zu verlangsamen (219). Die LDL-Apherese kommt neben homozygoten Patienten auch bei besonders schweren heterozygoten Formen der FH zum Einsatz, bei denen eine Medikamententherapie allein nicht ausreichend ist, um die Serum-LDL-Cholesterin-Werte zu senken. Trotz der Möglichkeiten, die die LDL-Apherese beim Verlangsamen der Atherosklerose-Entwicklung bietet, ist sie dennoch nicht in der Lage, diese komplett aufzuhalten, da zwischen den Behandlungen die Hypercholesterinämie wieder zunimmt. Eine Alternative zur LDL-Apherese ist die Lebertransplantation, von der bereits 1984 im Zusammenhang mit FH berichtet wurde. Es zeigte sich, dass diese Behandlungsmethode in der Lage ist, sowohl die LDL- als auch die Lp(a)-Werte deutlich zu senken (220). Das Problem einer Lebertransplantation besteht jedoch darin, dass es sich hierbei um eine schwerwiegende und kostenintensive Operation handelt, welche darüber hinaus eine lebenslange Suppression des Immunsystems erfordert. Eine weitere Möglichkeit der Behandlung von FH-Patienten stellt die Gentherapie dar. Zwischen 1994 und 1995 wurden bei 6 Patienten Teile der Leber entnommen und *ex vivo* mit LDL-R-enthaltenden Vektoren transfiziert. Anschließend wurden diese Zellen wieder in die Patienten rücktransplantiert und trugen dort zur Regeneration der Leber bei, welche nun den LDL-R exprimierte. Obwohl die Verträglichkeit durchweg gut war, fiel der lipid-senkende Effekt eher gering aus und ließ mit der Zeit deutlich nach (221-223). Zudem ist auch bei dieser Behandlungsstrategie eine Suppression des Immunsystems notwendig. Es sind daher neue Behandlungsmöglichkeiten dringend notwendig, um die Lebensqualität und Lebenserwartung von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie zu steigern.

3 Material und Methoden

3.1 Studienkollektiv

Alle FH-Patienten und Kontrollprobanden, die Teil dieser Studie sind, wurden über deren Inhalt und Zielsetzung informiert und haben schriftlich ihre Einwilligung zur Teilnahme erklärt. Das Studienkonzept und die damit verbundenen Arbeiten mit humanem Zellmaterial wurden von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität geprüft und genehmigt.

3.2 LDL-R-Mutationen

Die LDL-R-Mutationen, sowie Defekte in den Genen apo (a) und apoE der FH-Patienten, wurden an der Phillips-Universität Marburg detektiert und mittels PCR Amplifikation, denaturierender Gel-Gradienten Elektrophorese (DGGE) und anschließender Sequenzierung nachgewiesen (224).

3.3 Zellisolation

Für die Mikroarray-Analysen wurden pro untersuchten Zelltyp 8ml Vollblut unter Zuhilfenahme des BD Vacutainer CPT Systems (BD BioSciences, Heidelberg) dem Patienten entnommen und anschließend mittels RosetteSep Monocyte Enrichment bzw. RosetteSep T Cell Enrichment Antibody Cocktail (Cell Systems, St. Katharinen), dem Protokoll des Herstellers folgend, isoliert. Die Reinheit der Zellpräparationen wurde mit Hilfe von Durchflußzytometrie bestimmt. Es wurden nur Zellpräparationen verwendet, welche eine Reinheit von über 95%, hinsichtlich möglicher Verureinigungen durch T-Zellen bzw. Monozyten, B-Zellen und NK-Zellen aufwiesen (Abbildung 3-2 und 3-3).

3.4 Monozytenisolation und Kryokonservierung für die Zellkultur

Für die Zellkultur wurden 80ml Vollblut in Sarstedt Heparin Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen und je 15ml Vollblut im 50ml Falcon Röhrchen (Greiner BioOne, Frickenhausen) mit 15ml PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) verdünnt. Die Auftrennung der Zellen erfolgte durch Zugabe von RosetteSep Monocyte Enrichment Cocktail (Cell Systems, St. Katharinen) und Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll (Biochrom, Berlin), entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Die Reinheit der Zellpräparationen wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Es wurden nur Zellpräparationen verwendet, welche eine Reinheit von über 95%, hinsichtlich möglicher Verureinigungen durch T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen aufwiesen (Abbildung 3-2 und 3-3)

Die isolierten Monozyten wurden in 10% DMSO (Sigma Aldrich, München), 60% IMDM (Invitrogen, Karlsruhe) mit 30% hitze-inaktiviertem autologem Serum

resuspendiert und computerkontrolliert mit $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -80°C herabgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Für die Zellkulturassays wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen und in X-vivo15 Medium (Cambrex BioScience, Nottingham, Vereinigtes Königreich) resuspendiert. Es wurden je 1×10^5 Zellen pro well in 24-well Platten (Greiner BioOne, Frickenhausen) ausgesät und in X-vivo15 Medium kultiviert.

3.5 *Differentialblutbild, Bestimmung der Lipidwerte und oxLDL Bestimmung*

Zur Bestimmung eines Differentialblutbilds wurden 2,7ml Blut in einer EDTA-Sarstedt-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Zur Bestimmung des Lipidprofils wurden 2,7ml Blut in Lithium-Heparin-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen. Das Erstellen des Differentialblutbilds und des Lipidprofils erfolgte am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Jena. Zur Bestimmung der Serum-oxLDL-Werte wurde das oxLDL-ELISA-Kit (ImmunDiagnostik, Bensheim) entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet.

3.6 *RNA Extraktion*

Die aufgereinigten Zellen wurden in 1,5ml TRIZOL (Invitrogen, Karlsruhe) lysiert, die RNA durch Ausschütteln mit 500µl Chloroform (Sigma Aldrich, München) extrahiert und die organische Phase von der wässrigen Phase mittels 15ml PLG Tubes (Eppendorf, Hamburg) voneinander getrennt. Die in der wässrigen Phase enthaltene RNA wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Die RNA-Menge und der A_{260}/A_{280} Quotient zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen wurde mit einem NanoDrop Photospektrometer ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) bestimmt. Es wurden nur Proben verwendet, welche einen A_{260}/A_{280} Quotienten zwischen 1,9 und 2,1 aufwiesen. Die Integrität der RNA wurde mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn) überprüft. Es wurden nur Proben verwendet, welche eine RIN (RNA Integritäts Nummer) von mehr als 9 aufwiesen (RIN = 10 entspricht der bestmöglichen Integrität, RIN = 1 entspricht einer vollständig degradierten RNA, die Bewertung erfolgt aufgrund verschiedener RNA-Charakteristika, unter anderem des Verhältnisses vom 18S rRNA zum 28S rRNA Signal; dem Ladepuffer ist zur Berechnung des RNA-Gehalts ein Kontroll-Nukleotid mit definierter Menge und Größe beigemischt) (Abbildung 3-1).

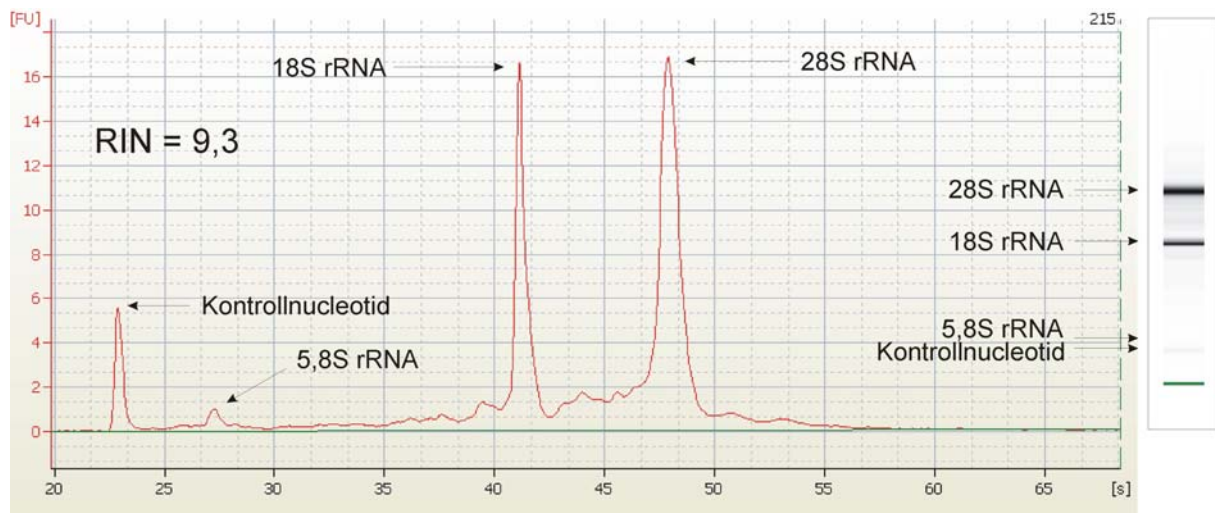


Abbildung 3-1 Typisches Elektropherogram einer verwendeten totalen RNA-Präparation

3.7 Mikroarray Analysen

Es wurden 1µg totale RNA mittels des One-Cycle Target Labeling und Control Kits (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) prozessiert und auf Affymetrix HG-U133A Plus 2.0 GeneChips hybridisiert. Nach dem Waschen und Färben in einer Affymetrix Fluidic Station 400 wurden die Arrays mittels des Affymetrix Scanner 3000 mit High Resolution Upgrade eingelesen. Die Rohdaten wurden mit der Affymetrix GCOS 1.3 Software prozessiert und nach Analyse des Qualitätsberichts der GCOS Software die Daten für eine weitere Analyse als .CEL Dateien nach GeneSpring GX 7.3 (Agilent Technologies, Waldbronn) exportiert. Dort wurden die Daten mittels des RMA Algorithmus (Robust Multi-Array Average) normalisiert (225). Für detaillierte Analysen wurden nur Gene als im jeweiligen Zelltyp exprimiert betrachtet, welche über alle Arrays des entsprechenden Zelltyps in mindestens der Hälfte der analysierten Arrays einen Expressionswert von mehr als 50 aufwiesen. Die Arrays wurden gruppiert in solche, die von homozygoten FH-Patienten, heterozygoten FH-Patienten und gesunden Kontrollen stammen. Differenziell exprimierte Gene wurden für Monozyten mittels eines parametrischen Welch T-Test mit anschließender Korrektur für multiples Testen nach Bejamini Hochberg (False Discovery Rate = 0.05) unter Annahme einer ungleichen Varianzverteilung ermittelt (226). Für T-Zellen wurde auf eine anschließende Korrektur für multiples Testen verzichtet.

Das Funktionelle Annotations Clustering wurde mittels des Internet-basierten Programms DAVID 2006 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) durchgeführt. Mittels Fisher Exact T-Test werden überrepräsentierte Gen-Ontologie (GO) Annotationen ermittelt und diese Gene durch eine anschließende Kappa Statistik heuristischen Clustern zugeordnet, deren enthaltene Gene, ähnlichen GO Familien angehören und biologisch, aufgrund ihrer Funktion oder der Lokalisierung des resultierenden translatierten Proteins, miteinander verwandt sind. Für alle resultierenden Cluster wird ein Signifikanzwert bestimmt. Die Signifikanz, der so genannte Gene Enrichment Score (GES), errechnet sich aus dem negativen Logarithmus des geometrischen Mittelwerts aller Fisher Exact p-Werte der einzelnen, dem Cluster angehörigen Gene. Dies bedeutet, dass ein hoher GES auch einer hohen Signifikanz entspricht (227, 228). Es wurden jeweils nur die drei signifikantesten Cluster für jede Analyse gezeigt.

3.8 *Quantitative Real-time PCR*

Für die quantitative Real-time PCR wurden 500ng totale RNA mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben. 30ng cDNA wurden zur Validierung pro Transkript und Probe eingesetzt. Für die Messung der einzelnen Transkripte wurden QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden) zusammen mit dem SYBR-Green RealMasterMix Kit (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Die Validierung der Expressionsdaten aus den Mikroarrayanalysen wurde auf einer Realplex²S PCR Maschine durchgeführt (Eppendorf, Hamburg). Für die Überprüfung der Spezifität und der genauen Anzahl der gemessenen Transkriptkopien wurde eine no-template Kontrolle (in dieser Probe ist keine DNA enthalten) sowie ein Standard mit bekannten Kopienzahlen des zu messenden Transkripts mitgeführt (5 Standards mit 200, 1.000, 5.000, 25.000 und 100.000 Kopien des zu messenden Transkripts). Um technisch bedingte Schwankungen weiter zu minimieren, wurden alle Messungen auf die zuvor gemessene Expression des „house keeping“ Gens Ubiquitin C (UBC) normalisiert. Zuvor wurde sichergestellt, dass UBC in allen Proben in gleichem Umfang exprimiert wird. Für die Vergleichbarkeit der relativen Genexpression zwischen FH-Patienten und Kontrollen wurden alle so normalisierten Messwerte nochmals auf den Median aller erhaltenen Quotienten für das betreffende Transkript normalisiert.

3.9 *LDL-Isolation, Präparation und Markierung*

Das LDL wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation mit einer Beckman Optima L-70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld) ($1.020 < d < 1.063$ g/l) aus dem frischen Serum gesunder Spender mit normalen Lipidwerten isoliert (229). Durch Ultrazentrifugation in einem Beckman SW40Ti Rotor für 20 Stunden bei 10°C mit 35.000rpm ($d=1.019$ und $d=1.063$ g/l) wurde das LDL isoliert und in einem Beckman VTi 65.1 Rotor für 4 Stunden bei 10°C mit 60.000rpm aufkonzentriert. Die jeweilige Dichte (d) wurde mit Kaliumbromid eingestellt. Das isolierte LDL wurde anschließend mehrfach gegen PBS mit 0.03% NaN_3 , 0,24mM Na_2EDTA bei 4°C dialysiert. Es wurde anschließend mit Stickstoff überschichtet und bis zu zwei Wochen bei 4°C gelagert. Alle folgenden Prozesse wurden in steriler Umgebung durchgeführt.

Zum Entfernen des verbliebenen NaN_3 und Na_2EDTA wurde das dialysierte LDL mittels PD-10 Säulen (GE Healthcare, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich) gereinigt. Mild oxidiertes LDL (moxLDL) wurde durch Inkubation für 6 Stunden bei 37°C in PBS (pH 7.4) mit 10 μM CuSO_4 oxidiert. Der Oxidationsprozess wurde anschließend durch Zugabe von Na_2EDTA gestoppt. Vor der weiteren Nutzung wurde das Na_2EDTA erneut mittels PD-10 Säulen entfernt. Der Oxidationsgrad wurde durch vier unabhängige Methoden überprüft (230-232):

- 1) Absorbanz bei 234nm zeigt die Präsenz von konjugierten Dienen in Fettsäuren an; moxLDL hatte eine $1,8 \pm 0,13$ fach höherer Absorbanz bei 234nm als nLDL
- 2) Absorbanz bei 485nm zeigt die Präsenz von beta-Karoten an; moxLDL hatte eine $3,0 \pm 0,5$ fach niedrigere Absorbanz bei 485nm als nLDL
- 3) Thiobarbituratsäure-reaktive-Substanzen Assay (TBARS); in moxLDL wurden 50,891 nmol Malondialdehyde (MDA) /mg LDL-Protein festgestellt, nLDL enthielt 0,104 nmol MDA/mg LDL-Protein

- 4) Elektrophoretische Mobilität in der SDS-PAGE: moxLDL zeigte eine höhere Elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu nLDL, wodurch ein höherer Oxidationsgrad von moxLDL verglichen mit nLDL angezeigt wird.

nLDL und moxLDL wurden mit dem Alexa Fluor 488 Labeling Kit (Molecular Probes, Karlsruhe) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers markiert. Die markierten nLDL und moxLDL wurden anschließend mit Stickstoff überschichtet, bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche eingesetzt.

Alle eingesetzten LDL-Präparationen wurden mit dem QCL-1000 LAL Kit (Cambrex BioScience, Nottingham, Vereinigtes Königreich) auf Endotoxine getestet und enthielten keine nachweisbaren Mengen an Endotoxinen (<0,02 EU/ml).

3.10 Bindungs- und Aufnahmestudien

Für die Bindungsassays wurden die Zellen, wie beschrieben, ausgesät und für 1 Stunde bei 4°C mit fluoreszenzmarkierten nLDL bzw. moxLDL in den angegebenen Konzentrationen im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und die Bindung von LDL mittels Durchflußzytometrie überprüft.

Für dosis- und zeitabhängige Aufnahmestudien, wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ zusammen mit nLDL bzw. moxLDL in den angegebenen Konzentrationen bzw. für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Nach der Inkubation wurden anhaftende Zelle mit Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und zusammen mit den Zellen im Überstand mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Markierung der Zellen mit 1µl Annexin V (BD BioSciences, Heidelberg) und 1µl 7AAD (BD BioSciences, Heidelberg) in 50µl FACS Puffer (1x PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) mit 0,5% BSA (Sigma Aldrich, München), 0,09% NaN₃ (Sigma Aldrich, München) für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und mittels Durchflußzytometrie gemessen.

Für die CD36-Blockade-Experimente wurden zunächst der Maus Kontroll-IgG Antikörper (Sigma Aldrich, München) und der anti-CD36 Antikörper FA6-152 (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) durch Endotrap Red 1/1 Säulen (Profos, Regensburg) von möglichen Endotoxinen befreit. Zur Blockade von CD36 wurden 10µg/ml FA6-152 und zur Kontrolle 10µg/ml Maus IgG Antikörper eingesetzt und die Monozyten damit vor der Zugabe von LDL 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen wie beschrieben behandelt. Alle Experimente wurden pro Patient bzw. Kontrolle wenigstens zweimal ausgeführt. Es werden jeweils repräsentative Ergebnisse gezeigt.

3.11 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrie-Messungen wurden an einem FACSCalibur (BD BioScience, Heidelberg) mit CellQuest Software (BD BioScience, Heidelberg) durchgeführt. Für die Überprüfung der Reinheit der Zellpräparationen wurden Antikörper gegen CD3 (T-Zellen), CD14 (Monozyten), CD19 (B-Zellen), CD56 (NK-Zellen) und CD235a (Erythrozyten) eingesetzt. Der Reinheitsgrad einer typischen Zellpräparation ist in Abbildung 3-2 für Monozyten und Abbildung 3-3 für T-Zellen gezeigt. Alle diese

Antikörper stammen von ImmunoTools (ImmunoTools, Friesoythe). Zur Messung der Proteinexpression wurden weiterhin eingesetzt, CD16 (ImmunoTools), CD36 (ImmunoTools), CD68 (Serotec, Düsseldorf), CD91/LRP1 (BD BioScience, Heidelberg). Antikörper gegen intrazelluläres und extrazelluläres Stabilin-1 wurden freundlicherweise von Dr. J. Kzhyshkowska, Dermatologische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim bereitgestellt. Die Analyse der zytometrischen Daten erfolgte mit FlowJo 7.1.3. (TreeStar, Ashland, OR, USA).

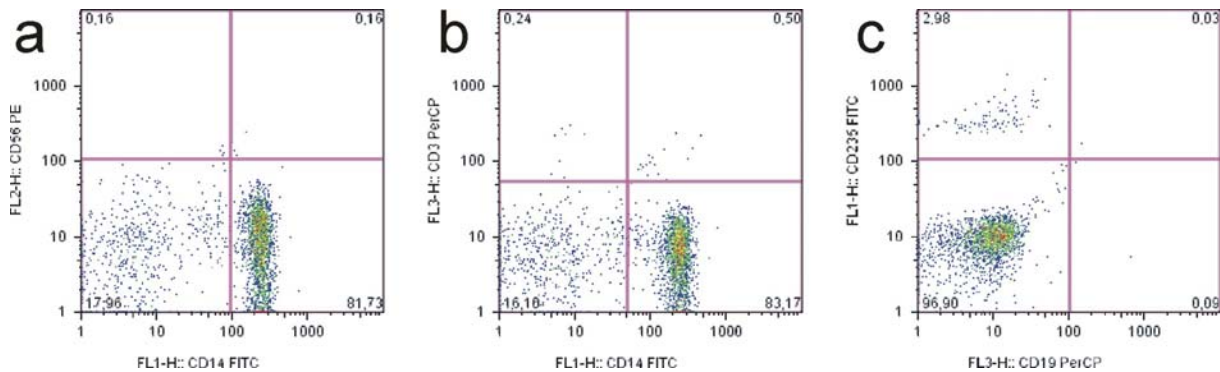


Abbildung 3-2 Reinheitskontrolle isolierter Monozyten (repräsentative Messungen); Untersuchung auf Verunreinigungen durch a) NK-Zellen, b) T-Zellen, c) B-Zellen und Erythrozyten; die Verunreinigung von Monozyten durch NK-Zellen, B-Zellen, Erythrozyten und T-Zellen lag unter 5%

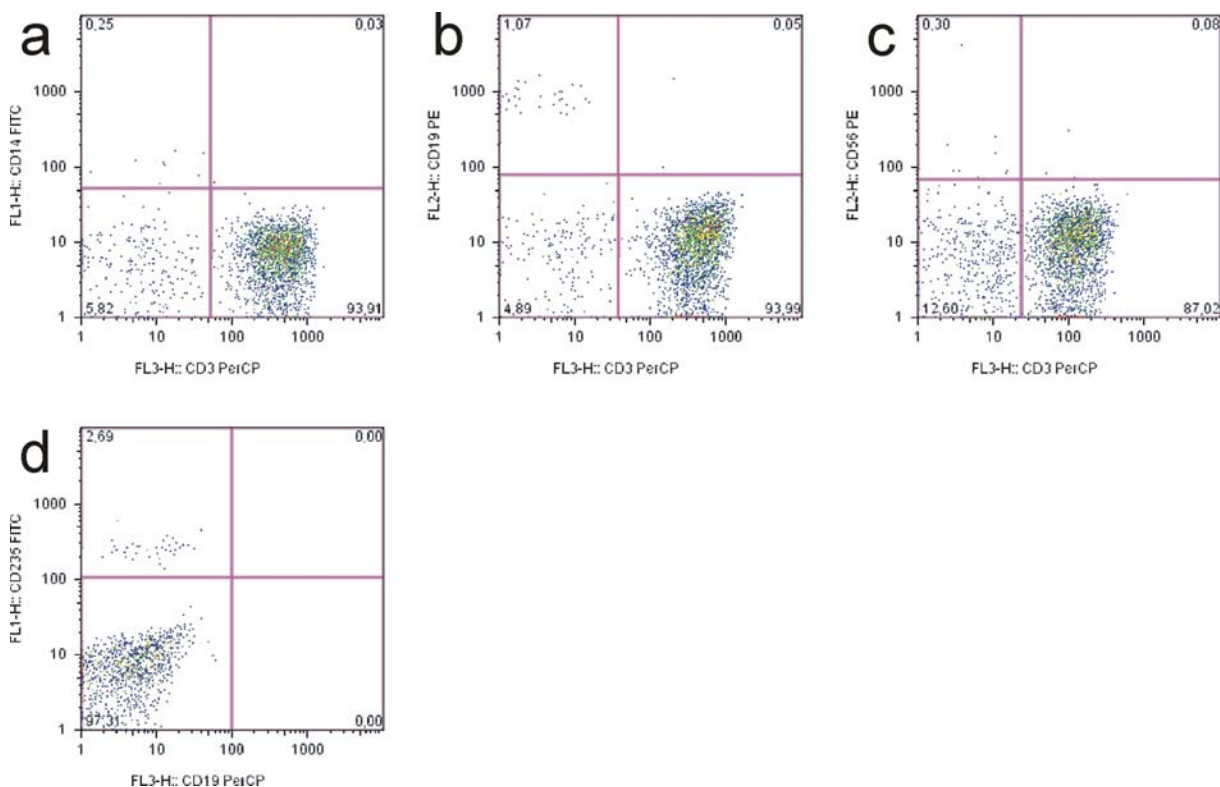


Abbildung 3-3 Reinheitskontrolle isolierter T-Zellen (repräsentative Messungen); Untersuchung auf Verunreinigungen durch a) Monozyten, b) B-Zellen, c) NK-Zellen, d) Erythrozyten; die Verunreinigung der T-Zellen durch NK-Zellen, B-Zellen, Erythrozyten und Monozyten lag unter 5%

3.12 Western Blot Analysen

Für die Western Blot Analyse wurden folgende Antikörper eingesetzt: anti-beta-Actin (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-ABCA1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-SCAP und anti-NPC1 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), anti-CD36 (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich), anti-LRP1 (freundlicherweise von Dr. D.K. Strickland, Department Vascular Biology, Holland Laboratory, American Red Cross, Rockville, MD, USA, zur Verfügung gestellt) und anti-CALR (BD BioScience, Heidelberg). Die sekundären Antikörper waren Ziege-anti-Maus, Kaninchen-anti-Ziege sowie Ziege-anti-Kaninchen, diese waren alle Meerrettichperoxidase-konjugiert (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Es wurden pro Patient bzw. Kontrolle 1×10^6 Zellen isoliert und in 200 μ l Lysispuffer (50nM Tris pH 7,5, 150nM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 100 μ g/ml Aprotinin, 1 μ M PMSF, 100 μ M Leupeptin) lysiert. Vor der Analyse wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation aus dem Lysat entfernt und pro Individuum 10 μ g Protein (abhängig vom verwendeten Antikörper im reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Puffer) auf das SDS-Gel aufgetragen. Immunreaktive Banden wurden mit Enhanced-Chemolumineszenz (ECL) (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) und CL-XPosure (Pierce Biotechnology, Bonn) sichtbar gemacht. Die densitometrische Auswertung wurde mittels ImageQuant TL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich) vorgenommen und für die beta-Actin Expression korrigiert.

3.13 Statistische Analyse und grafische Aufbereitung

Statistische Tests wurden mittels SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde ein zweiseitiger Student's T-Test durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. In den Figuren ist die jeweilige Signifikanz der Ergebnisse mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ angegeben. Histogramm-Abbildungen wurden mittels SigmaPlot 9 (Systat Software, Erkrath) erstellt.

4 Resultate

4.1 *Vorarbeiten zur Untersuchung der GEP von weißen Blutzellen*

4.1.1 **Prinzipielle Unterschiede in den GEP verschiedener Populationen weißer Blutzellen**

Zu Beginn der Studie sollte zunächst geklärt werden, ob weiße Blutzellen geeignet sind, um physiologische Prozesse in ihrem Genexpressionsprofil (GEP) abzubilden. Zunächst mussten dazu die prinzipiellen Unterschiede in den GEP zwischen der Gesamtheit aller weißen Blutzellen (WBC, engl. „white blood cells“), den mononuklearen peripheren Blutzellen (PBMC, engl. „peripher blood mononuclear cells“) und T-Zellen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde drei verschiedenen Probanden (Probanden A-C) Blut entnommen und aus diesem jeweils WBC, PBMC und T-Zellen isoliert. Die RNA wurde unmittelbar nach der Zellisolation extrahiert und bis zur weiteren Prozessierung bei -20°C gelagert. Die Messung der GEP der drei Zelltypen erfolgte auf Affymetrix HG-U 133A 2.0 GeneChips. Signifikant verändert exprimierte Gene zwischen den Zelltypen wurden mittels 1-Weg-ANOVA Test und einer anschließenden Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni (FDR=0,05) ermittelt. Es zeigte sich, dass zwischen den einzelnen Zelltypen 1.340 Transkripte unterschiedlich exprimiert werden. Eine anschließende hierarchische Clusteranalyse auf Basis dieser differentiell exprimierten Gene war ausreichend, um unabhängig von den einzelnen Probanden eine Klassifizierung des Zelltyps vorzunehmen. Abbildung 4-1 zeigt deutlich die Präsenz von drei Genclustern, welche aus Genen bestehen, die in den jeweiligen Zelltypen besonders stark exprimiert werden. Hierbei ist die Varianz in den GEP von T-Zellen zwischen den einzelnen Probanden am geringsten.

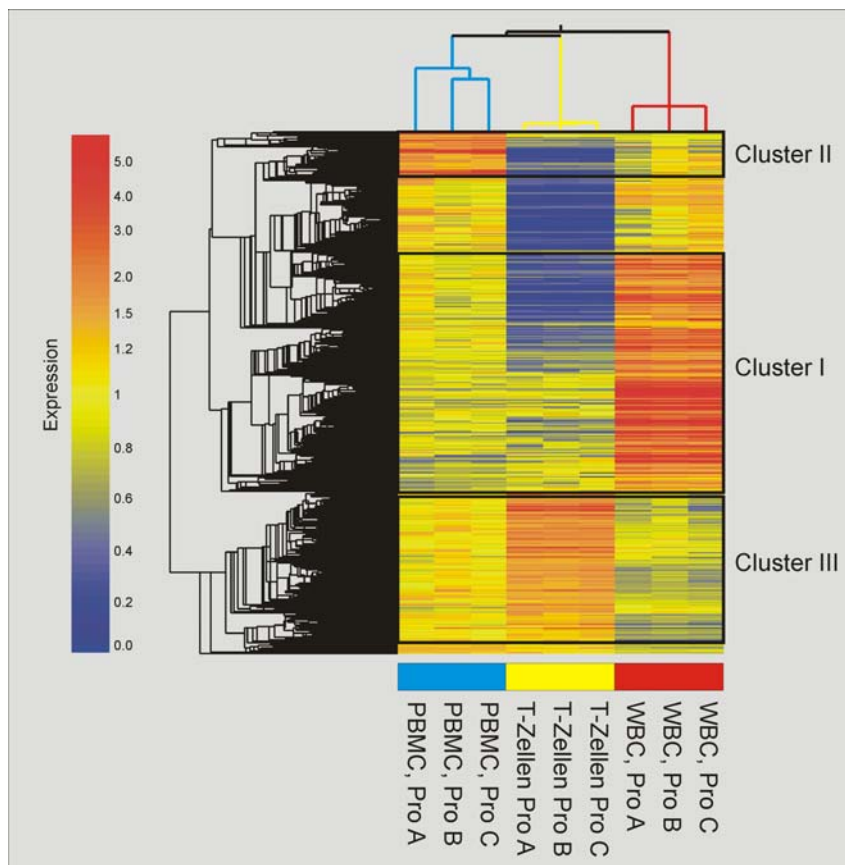


Abbildung 4-1: Clusteranalyse der GEP von WBC, PBMC und T-Zellen. Cluster I enthält Gene, welche besonders stark in WBCs exprimiert werden. Gene in Cluster II werden verstärkt in PBMCs und Gene in Cluster III vermehrt in T-Zellen exprimiert. Pro A, B, C geben die Probanden A, B und C. an

Um die Spezifität dieser Gene für die betreffenden Zelltypen zu überprüfen, wurde ein Vergleich mit bereits publizierten Daten durchgeführt. In den Arbeiten von *Whitney et al.* (233) und *Palmer et al.* (234) wurden mittels Microarrayanalysen ebenfalls Gene ermittelt, welche verstärkt in Granulozyten und Lymphozyten exprimiert werden. Ein direkter Vergleich zeigt, dass 55,3% der von *Whitney et al.* für Granulozyten spezifisch beschriebenen Gene bzw. 32,9% der von *Palmer et al.* als Granulozyten spezifisch beschriebenen Gene auch verstärkt in der Gesamtpopulation von WBCs exprimiert werden (Abbildung 4-2a). Ein Vergleich der in PBMCs verstärkt exprimierten Gene mit den als "Lymphozyten-spezifisch" beschriebenen Genen, zeigt jedoch eine sehr geringe (*Whitney et al.*) bzw. keine Übereinstimmung (*Palmer et al.*) (Abbildung 4-2b). Interessanterweise, gibt es auch bei einem direkten Vergleich der in beiden Publikationen als Lymphozyten spezifisch beschriebenen Gene keinerlei Übereinstimmung. In der Arbeit von *Palmer et al.*, wurden zusätzlich Gene beschrieben, welche verstärkt in T-Zellen exprimiert werden. Auch hier zeigt ein Vergleich dieser T Zell-spezifischen Gene mit den Genen aus Cluster III (in T-Zellen verstärkt exprimiert) nur eine geringe Übereinstimmung (Abbildung 4-2c).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Varianzen, welche in Microarrayanalysen auftreten können. Die Gründe dafür liegen sehr wahrscheinlich in der Verwendung unterschiedlicher Microarraysysteme, unterschiedlicher Konservierungen der Blutproben und den verschiedenen Protokollen, welche bei der Prozessierung der RNA verwendet wurden. So wurde in den Arbeiten von *Whitney et al.* und *Palmer et al.* für die Isolation der RNA aus WBC das "PaxGene Blood RNA" System zur RNA-Stabilisierung eingesetzt und die eigentliche RNA-Extraktion zeitversetzt durchgeführt, wohingegen die RNA-Isolation aus WBCs in dieser Studie sofort erfolgte. Darüber hinaus wurde ein anderer Microarray-Typ verwendet und somit auch eine andere Prozessierung der RNA durchgeführt.

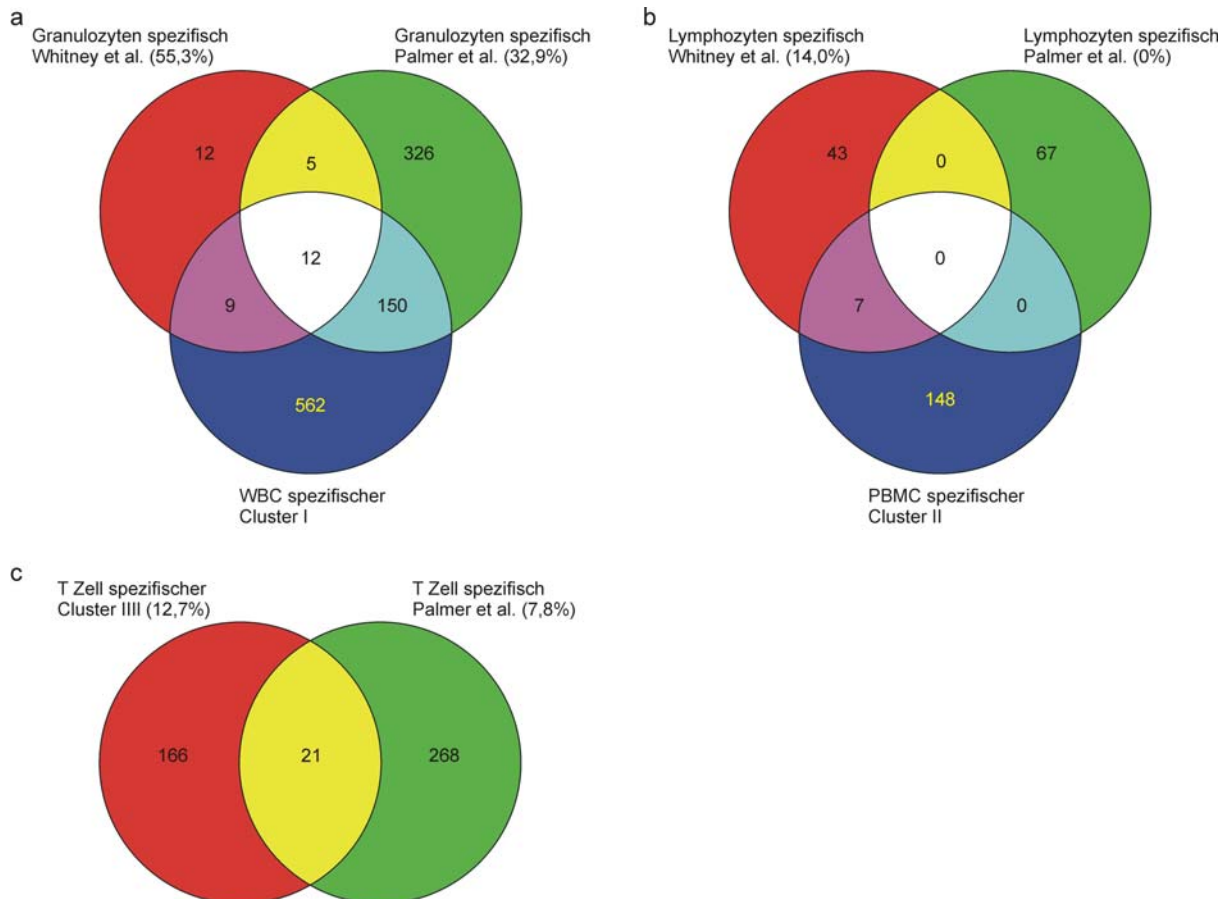


Abbildung 4-2: Venn-Diagramme der verschiedenen als zelltypspezifisch exprimiert beschriebenen Gene von *Whitney et al.* und *Palmer et al.* mit den in den Clustern I-III enthaltenen Genen; a) Vergleich Granulozyten spezifischer Gene mit den in Cluster I enthaltenen Genen; b) Vergleich der Lymphozyten spezifischen Gene mit den Genen aus Cluster II (PBMC); c) Vergleich der T Zell spezifischen Gene mit den in Cluster III (T-Zellen) enthaltenen Genen; in a) und b) ist jeweils der prozentuale Anteil der Gene in Cluster I bzw. II an den als Granulozyten spezifisch bzw. Lymphozyten spezifisch beschriebenen Genen von *Whitney et al.* und *Palmer et al.* aufgeführt; in c) ist der prozentuale Anteil an der jeweils anderen Genmenge angegeben

Um die Spezifität der ermittelten Gene näher zu untersuchen, wurde das Modell der physischen Belastung gewählt und Untersuchungen an jeweils drei verschiedenen gesunden männlichen Probanden durchgeführt, welche bis zur Erschöpfung auf einem Laufband trainierten. Ein bekannter Effekt bei erschöpfendem Training ist die Verschiebung der einzelnen Populationen der weißen Blutzellen, welcher auch als biphasische Antwort bekannt ist (235-237). Hierbei tritt eine Stunde nach der Belastung typischerweise ein Ansteigen der Gesamtzahl der Granulozyten und gleichzeitig ein Absinken der Gesamtzahl der Lymphozyten auf. Es sollte geklärt werden, ob sich diese Zellpopulationsverschiebungen mit Hilfe der hier erhaltenen Gencluster nachvollziehen lassen. Um eine Vergleichbarkeit der individuellen Messungen zu gewährleisten, wurde bei jedem Probanden zunächst das maximale Atemvolumen bestimmt. Dazu starteten alle drei Probanden ihr Training auf einem Laufband bei gleicher Anfangsgeschwindigkeit von 2 m/s. Diese wurde dann kontinuierlich alle 3min um 0,5 m/s erhöht und ihr jeweiliges Atemvolumen bestimmt. Der Test wurde fortgeführt, bis die Probanden erschöpft waren. Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurde für die einzelnen Probanden jeweils die Geschwindigkeit gewählt, bei der sie 80% ihres maximalen Atemvolumens erreicht hatten. Den Probanden wurde unmittelbar vor dem Training und eine Stunde nach

dem Training Blut entnommen, die betreffenden Zellen isoliert und die RNA extrahiert und bei -20°C gelagert. Zusätzlich wurde bei jeder Blutentnahme ein Differentialblutbild erstellt.

Bei allen untersuchten Probanden konnte der Effekt der biphasischen Antwort festgestellt werden. Dabei stieg die Gesamtzahl der Granulozyten vor Belastung von $3,07 \pm 0,47$ Gpt/l auf $4,37 \pm 0,95$ Gpt/l nach Belastung an. Die Gesamtmenge der Leukozyten vor Belastung fiel von $1,63 \pm 0,13$ Gpt/l auf $1,20 \pm 0,09$ Gpt/l. In Abbildung 4-3 ist die Expression der Gencluster I-III in WBC vor und nach Belastung dargestellt. Es ist dabei zu erkennen, dass Gene, welche dem Cluster I angehören, nach erschöpfendem Training stärker exprimiert werden und damit einen Anstieg der Granulozytenzahl widerspiegeln. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Expression PBMC-typischer Gene vor und nach Belastung nicht verändert ist, wohingegen Gene des Clusters III, welche in T-Zellen vermehrt exprimiert werden, nach Belastung in den GEP von WBCs weniger stark exprimiert werden.

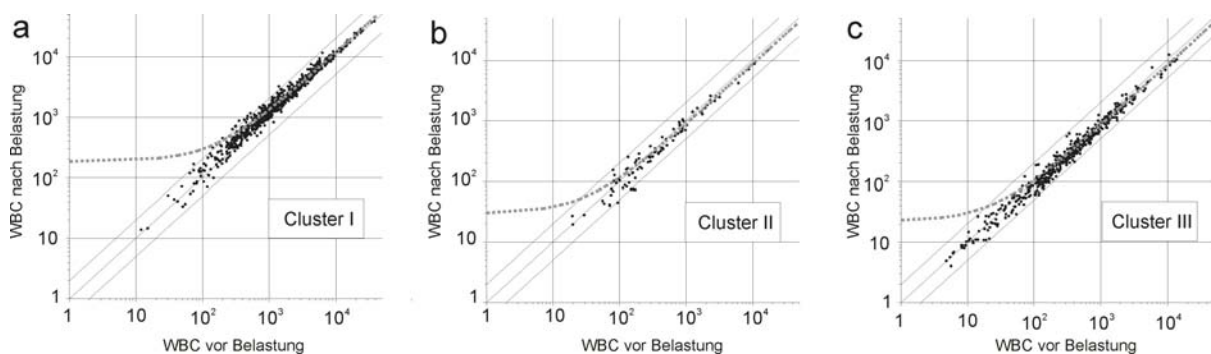


Abbildung 4-3 Relative Verschiebung populationsspezifischer Markergene aus den Clustern I-III in den GEP von WBC vor und nach physischer Belastung, a) Die Expression WBC-spezifischer Gene steigt nach Belastung an und reflektiert damit steigende Granulozytenzahlen. **b)** Gene, welche in PBMC verstärkt exprimiert werden, sind vor und nach Belastung nicht differentiell exprimiert. **c)** Reduzierte Expression T-Zell-spezifischer Gene in den GEP von WBCs nach Belastung. Die eingezeichneten Linien repräsentieren die Schwelle zur zweifach erhöhten bzw. zweifach erniedrigten Expression.

Ein weiterer Hinweis auf Verschiebungen von Granulozyten und T-Zellen findet sich bei der Betrachtung der Expression zelltypspezifischer Oberflächenmarker. Hierbei sind die Oberflächenmarker CD66 und CD66d spezifisch für Granulozyten und die Marker CD3, CD8, CD28 und CCR7 spezifisch für verschiedene T Zell-Subtypen (238-241). Alle diese Marker folgen in ihrer Expression den jeweiligen Anteilen an Granulozyten und T-Zellen innerhalb der drei untersuchten Zellpopulationen (Abbildung 4-4).

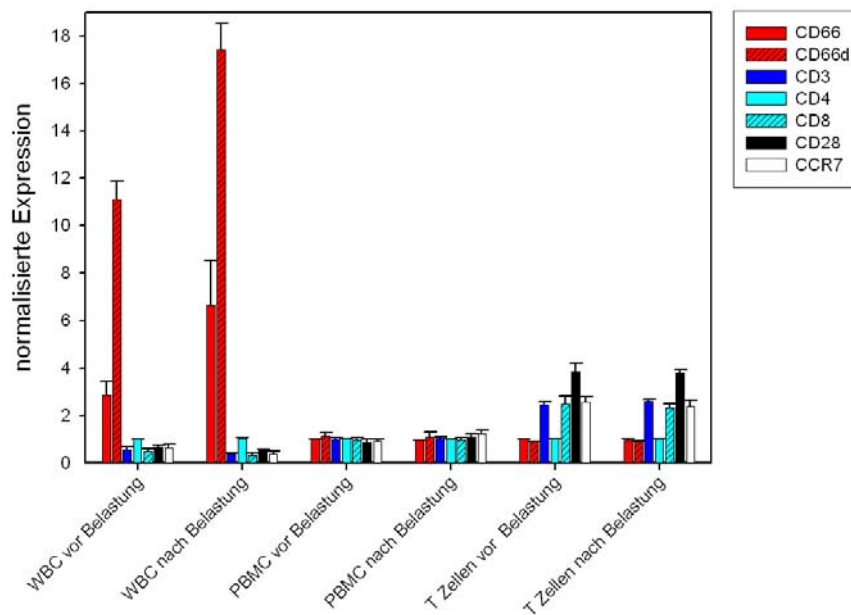


Abbildung 4-4: Änderungen der zellulären Zusammensetzung von WBC nach physischer Belastung ist anhand der Expression zelltypspezifischer Oberflächenmarker nachvollziehbar; Eine absinkende Anzahl an zirkulierenden Granulozyten nach Belastung korreliert mit einer niedrigeren Expression der Granulozyten spezifischen Oberflächenmarker CD66 und CD66d in den GEP von WBC nach Belastung. CD3, ein T Zell-spezifischer Oberflächenmarker, korreliert ebenfalls in den GEP von WBC mit

dem Abfall der Gesamt-Lymphozyten nach physischer Belastung. In den GEP von PBMCs und T-Zellen findet sich eine deutlich niedrigere Expression von CD66 und CD66d, die Expression von T-Zell spezifischen Markern ist bei GEP von PBMCs erhöht und innerhalb der GEP von T-Zellen am stärksten.

Damit konnte gezeigt werden, dass der relative Anteil der Granulozyten und T-Zellen in WBCs in deren GEP semiquantitativ abgebildet wird.

4.1.2 Die GEP weißer Blutzellen reflektieren physiologische Prozesse

Es wurde nun geprüft, ob diese Art der Analyse auch geeignet ist, physiologische Änderungen innerhalb der einzelnen Zellen infolge physischer Belastung zu detektieren. Untersuchungen an T-Zellen haben ergeben, dass erschöpfende physische Belastung zur Aktivierung von T-Zellen führt und darüber hinaus zur Induktion von Apoptose führen kann (242, 243). Aus diesem Grund wurden die GEP aller Zellpopulationen vor und nach Belastung analysiert und nach Hinweisen für eine T-Zellaktivierung bzw. Apoptose gesucht. In GEP von T-Zellen konnte eine deutliche Heraufregulation der Expression von Markern der T-Zellaktivierung (CD9, CD166, CD103, CD69, CD134) nach Belastung beobachtet werden. Dies war auch innerhalb der GEP von PBMCs möglich, jedoch auf einem geringeren Expressionsniveau. In GEP von WBCs war eine T-Zellaktivierung nicht sichtbar. Hier wurden sogar teilweise gegenläufige Expressionsänderungen beobachtet (Abbildung 4-5a). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Induktion der Apoptose erhalten. So wird in T-Zellen nach Belastung die mRNA des anti-apoptotischen Gens BCL-2L1 herunterreguliert, wohingegen die pro-apoptotischen Gene für Caspase 6 (CASP6), CASP7, CASP9 sowie für die mitochondriale Endonuklease G (ENDO G) heraufreguliert werden. In PBMCs sind diese Regulationsmechanismen ebenfalls sichtbar. In WBCs gibt es ähnlich wie bei der T-Zellaktivierung teilweise gegenläufige Effekte (Abbildung 4-5b).

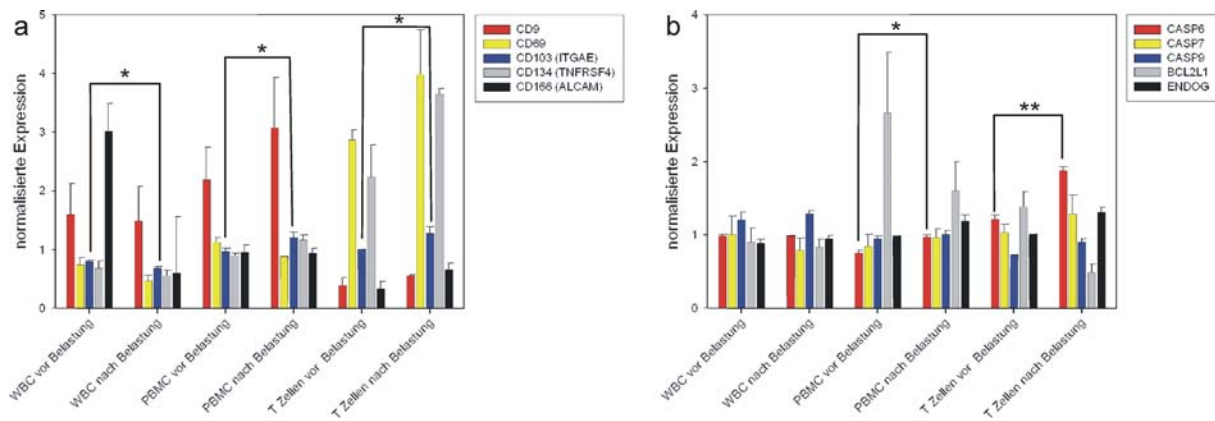


Abbildung 4-5: Physische Belastung induziert die Aktivierung und Apoptose in T-Zellen. a) T-Zellaktivierungsmarker sind in den GEP von T-Zellen nach Belastung deutlich stärker exprimiert, verglichen mit T-Zellen vor Belastung. In den GEP von PBMCs sind diese Prozesse mit Ausnahme von CD69 ebenfalls sichtbar. In den GEP von WBC wird die Regulation der T-Zellaktivierungsmarker überlagert und zeigt eine zum Teil gegenläufige Expressionsänderung. b) Wie die T-Zellaktivierung, ist auch die Induktion der Apoptose in den GEP von T-Zellen deutlich sichtbar. Die proapoptotischen Gene CASP6, 7, 9 und ENDOG werden in T-Zellen nach Belastung, verglichen mit T-Zellen vor Belastung, stärker exprimiert. Gleichzeitig sinkt die Expression des antiapoptotischen Gens BCL2L1 ab. In den GEP von PBMCs sind diese Prozesse in Ansätzen wieder zu finden, in den GEP von WBC werden diese T Zell spezifischen Veränderungen, ähnlich wie bei Prozessen der T-Zellaktivierung, durch die Expression weiterer Zellen überlagert. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Es lässt sich aus den Ergebnissen dieser Vorversuche schließen, dass physiologische Prozesse wie eine erschöpfende körperliche Belastung, Einfluss auf die Regulation des Transkriptoms von weißen Blutzellen haben (244). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Regulationsprozesse vor dem Hintergrund weiterer anwesender Zellpopulationen maskiert werden können und eine Aufreinigung einzelner Zellpopulationen zu einer Steigerung der Sensitivität von Microarray-Analysen beitragen kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Untersuchungen ausschließlich einheitliche Zellpopulationen verwendet. Hierzu wurden Monozyten und T-Zellen von homozygoten und heterozygoten FH-Patienten, sowie von gesunden Probanden aufgereingt. Die Aufreinigung erfolgte, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, mittels einer Depletionsstrategie, wobei Antikörper verwendet wurden, welche an die spezifischen Oberflächenmarker unerwünschter Zelltypen binden. Diese komplexieren unter der Zuhilfenahme weiterer Antikörper mit Erythrozyten und bilden dadurch Zellaggregate mit einer höheren Dichte, welche durch Gradientenzentrifugation abgetrennt werden können. Der Vorteil dieser Methodik liegt darin, dass keine direkte Antikörperbindung an die gewünschten Zellen erfolgt und damit das Risiko einer ungewollten Zellaktivierung deutlich verringert wird. Darüber hinaus bietet sie die Möglichkeit einer sehr schnellen Aufreinigung der Zellen in weniger als einer Stunde. Dadurch und durch eine Durchführung der Waschschrte bei 4°C sollte sichergestellt werden, dass die gemessenen GEP denen von zirkulierenden Zellen möglichst genau entsprechen. Etwaige Verunreinigungen mit T-Zellen bzw. Monozyten, B-Zellen, NK-Zellen und Erythrozyten wurden standardmäßig mittels Durchflußzytometrie erfasst. Es wurden nur Präparationen verwendet, welche eine Reinheit von über 95% aufwiesen.

4.2 Untersuchungen an Monozyten und T-Zellen von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie

4.2.1 Studienkollektiv

Es wurden Monozyten von 5 homozygoten und 7 heterozygoten FH-Patienten sowie 13 gesunden Probanden isoliert und in die Untersuchungen einbezogen. T-Zellen wurden von 3 homozygoten, 9 heterozygoten und 12 gesunden Probanden isoliert. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei einigen der FH-Patienten um Kinder zwischen 3 und 5 Jahren handelt, war die zur Verfügung stehende Blutmenge begrenzt und erklärt die unterschiedlichen Patientenzahlen bei den Monozyten und T-Zellen. Bei der Auswahl der gesunden Kontrollpatienten wurde darauf geachtet, dass diese den untersuchten Patienten hinsichtlich Alter und Geschlecht möglichst genau entsprechen. Keiner der Kontrollprobanden war zum Zeitpunkt der Probennahme erkrankt oder nahm Medikamente. Für die Mikroarray-Analysen wurden von jedem Probanden am gleichen Tag jeweils Monozyten und T-Zellen isoliert, so dass ein direkter Vergleich zwischen beiden Zelltypen möglich ist. Zusätzlich wurden von jedem Probanden ein Differentialblutbild und ein Lipidprofil erstellt. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die klinisch relevanten Daten des Studienkollektivs. In Tabelle 7 sind die bei den FH-Patienten detektierten LDL-R-Mutationen aufgeführt.

	homozygote FH	heterozygote FH	Kontrollen
Geschlecht	weiblich n=3, männlich n=2	weiblich n=5, männlich n=2	weiblich n=8, männlich n=5
Alter (Jahre)	30,2 ± 11,1	28,8 ± 7,5	32,7 ± 5,7
Cholesterin (mmol/l)	15,32 ± 2,02	7,8 ± 0,96	4,72 ± 0,66
LDL (mmol/l)	12,91 ± 1,87	5,71 ± 0,65	2,71 ± 1,34
HDL (mmol/l)	1,51 ± 0,16	1,25 ± 0,10	1,49 ± 0,15
Triglyceride (mmol/l)	2,16 ± 0,68	2,67 ± 1,82	1,39 ± 0,61
Lp(a) (mg/l)	901,2 ± 416,6	529 ± 475,5	348,6 ± 202,1
Statintherapie (%)	40,0	57,1	0
Neutrophile Granulozyten (Gpt/l)	2,92 ± 0,83	2,97 ± 0,33	3,85 ± 0,82
Eosinophile Granulozyten (Gpt/l)	0,54 ± 0,17	0,24 ± 0,10	0,16 ± 0,11
Basophile Granulozyten (Gpt/l)	0,38 ± 0,19	0,18 ± 0,09	0,15 ± 0,10
Lymphozyten (Gpt/l)	1,65 ± 0,44	2,77 ± 1,72	1,94 ± 0,27
Monozyten (Gpt/l)	0,60 ± 0,13	0,56 ± 0,09	0,58 ± 0,13
Thrombozyten (Gpt/l)	228 ± 38,49	237,89 ± 34,03	226, 65 ± 30,59
Erythrozyten (Tpt/l)	3,87 ± 0,36	4,49 ± 0,27	4,35 ± 0,44

Tabelle 6: Überblick über das Studienkollektiv

homozygote FH	Mutation
Patient A	LDL-R Bindungsdefekt nachgewiesen
Patient C	C88R (FH Münster 1), D333G (FH Münster 2); 15-30% LDL-R Aktivität, Bindungsdefekt
Patient K1	W556R (FH Moscow); < 2% LDL-R Aktivität, Bindungsdefekt
Patient K2	W556R (FH Moscow); < 2% LDL-R Aktivität, Bindungsdefekt
Patient G	W556R (FH Moscow); < 2% LDL-R Aktivität, Bindungsdefekt
heterozygote FH	Mutation
Patient B	Promtordefekt bei -135bp C->G; 5-15% LDL-R Aktivität
Patient D	C88R (FH Münster 1) 15-30% LDL-R Aktivität, Bindungsdefekt
Patient E	D333G (FH Münster 2); 5-15% LDL-R Aktivität, Bindungsdefekt
Patient F	C88R (FH Münster 1) 15-30% LDL-R Aktivität, Bindungsdefekt

Patient M	LDL-R Bindungsdefekt nachgewiesen
Patient V	W556R (FH Moscow); < 2% LDL-R Aktivität , Bindungsdefekt
Patient DW	Insertion von Base G bei 588bp, führt zu Frameshift und STOP Codon bei Aminosäure 178
Patient LW	Insertion von Base G bei 588bp, führt zu Frameshift und STOP Codon bei Aminosäure 178

Tabelle 7: Nachgewiesene LDL-R Mutationen im Patientenkollektiv

4.2.2 Mikroarray-Analysen

Ein direkter Vergleich von Monozyten und T-Zellen zeigt deutliche Unterschiede zwischen beiden Zelltypen hinsichtlich ihrer GEP. Innerhalb eines Zelltyps waren die Korrelationen sehr gut und reproduzierbar (Monozyten $r^2=0,99$, T-Zellen $r^2=0,97$) (Abbildung 4-6)

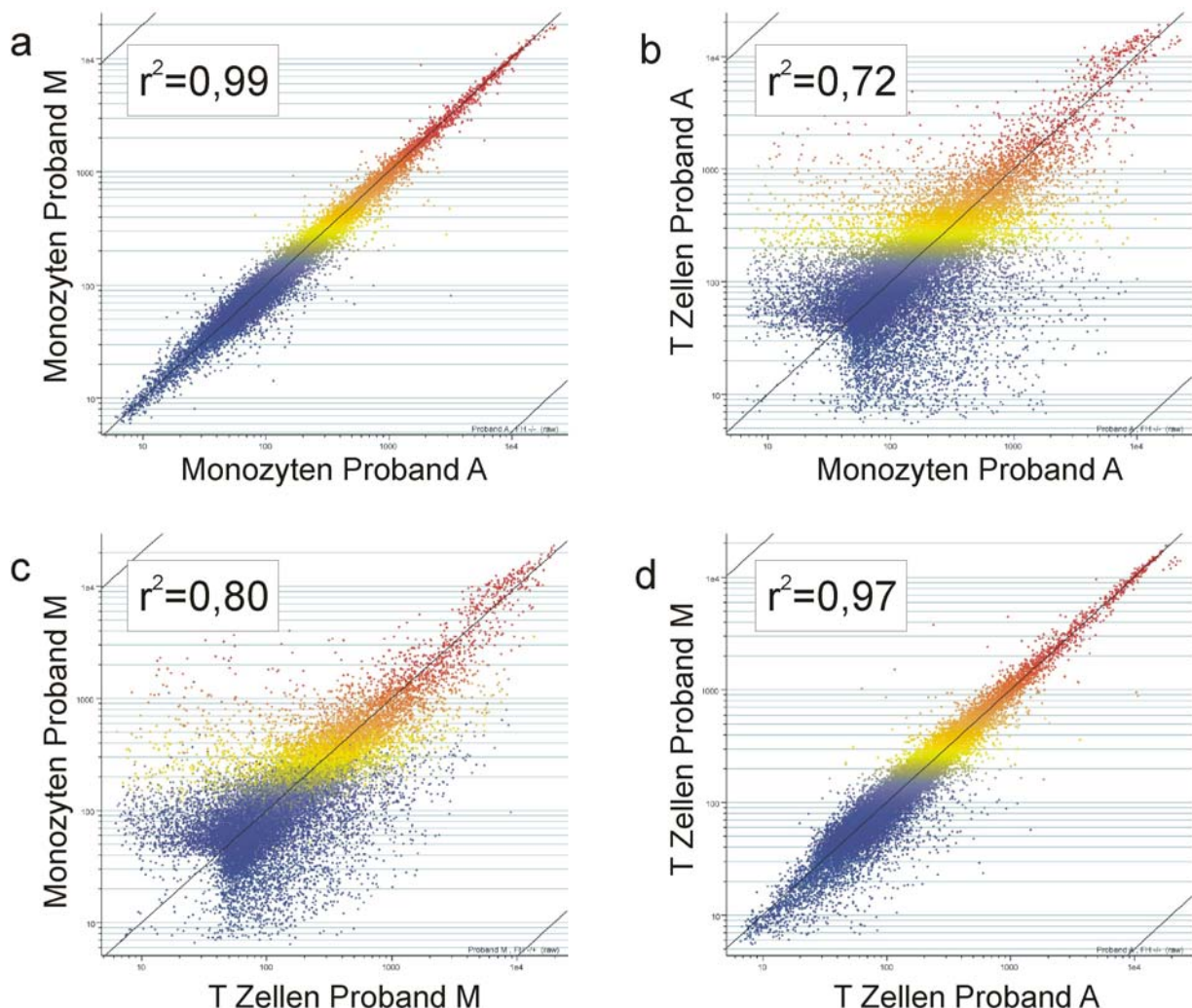


Abbildung 4-6 Vergleich der GEP von Monozyten und T-Zellen: Die GEP von T-Zellen und Monozyten von zwei unterschiedlichen Probanden zeigen eine höhere Korrelation (**a und d**) als die GEP von Monozyten und T-Zellen des gleichen Probanden (**b und c**).

Für die Analyse der Microarray-Daten wurden nur Transkripte berücksichtigt, welche mindestens einen Expressionswert von 50 nach erfolgter Normalisierung durch RMA

aufwiesen (225). Das genaue Vorgehen ist im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Durch dieses Verfahren wurden in diesen Zellen nicht exprimierte Transkripte ausgeschlossen und die Zahl der falsch positiven Ergebnisse reduziert.

Eine einleitende Analyse wurde zunächst mittels „Principal Component Analysis“ (PCA) durchgeführt. Bei dieser statistischen Auswertung, werden die Varianzen in der Expression aller Transkripte über alle gemessenen Arrays analysiert und zu Faktoren (Eigen-Vektoren) zusammengefasst, welche diese Varianzen bestimmen. Anschliessend werden alle gemessenen Proben in einem dreidimensionalen Raum dargestellt, wobei die Lage jeder einzelnen Probe vom Einfluss der drei stärksten berechneten Faktoren abhängt. Auf diese Weise werden Proben mit ähnlichen, die Genexpression bestimmenden Eigenschaften auch räumlich ähnlich dargestellt (245). Bei der Analyse der GEP von Monozyten vor dem Hintergrund von 21.044 exprimierten Transkripten fällt auf, dass die Proben der gesunden Kontrollindividuen eine gemeinsame Lage im Raum haben (blaue Punkte, Abbildung 4-7a). Die Proben der FH-Patienten sind von denen der Kontrollen separiert und mehr gestreut (homozygote FH-Patienten rot, heterozygote FH-Patienten gelb). Das Ergebnis der PCA-Analyse offenbart, dass Monozyten von FH-Patienten anhand ihrer Genexpression deutlich von den Monozyten gesunder Kontrollpatienten unterscheidbar sind. Im Gegensatz zu den Monozyten zeigt die PCA-Analyse der GEP der T-Zellen keine klare Auftrennung von FH-Proben und Kontrollen (Abbildung 4-7b). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Monozyten und T-Zellen unterschiedlich auf einen LDL-R-Defekt reagieren.

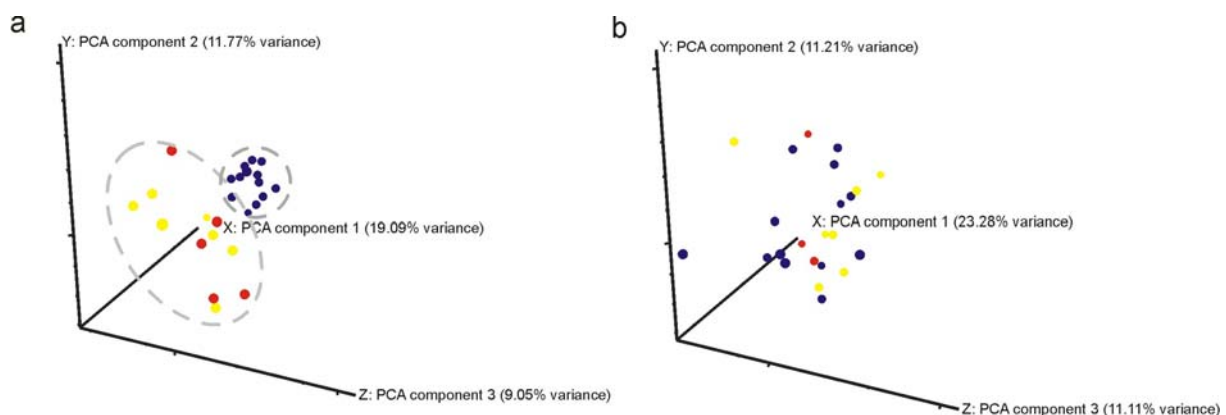


Abbildung 4-7 Principal Component Analysis der GEP von FH-Patienten und Kontrollen, a) Die Unterschiede in der Genexpression der 21.044 Transkripte, welche in Monozyten exprimiert werden, sind ausreichend für eine Unterscheidung zwischen FH-Patienten und Kontrollen. **b)** Im Gegensatz zu den GEP von Monozyten sind die Unterschiede in der Regulation der 20.025 in T-Zellen exprimierten Transkripte nicht ausreichend, um eine Unterscheidung zwischen FH-Patienten und Kontrollen vorzunehmen. (Rot – homozygote FH, Gelb – heterozygote FH, Blau – Kontrollen)

Um der Frage nachzugehen, welche Gene zwischen FH-Patienten und Kontrollprobanden unterschiedlich exprimiert werden, wurde eine genauere statistische Analyse vorgenommen. Mittels Welsch T-Test und anschliessender Korrektur für multiples Testen nach Benjamini-Hochberg ($FDR=0,05$), wurden 1.552 unterschiedlich exprimierte Gene in Monozyten gefunden. Die gleiche Analyse wurde für die GEP von T-Zellen angewandt. Diese ergab lediglich 3 unterschiedlich regulierte Transkripte in T-Zellen und spiegelt somit das oben beschriebene Ergebnis der PCA-Analyse wieder. Für weitere Analysen der GEP von T-Zellen wurde daher die statistische Stringenz herabgesetzt, indem auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet wurde. Auf diese Weise wurden 2.444

Transkripte identifiziert, welche in T-Zellen zwischen FH-Patienten und Kontrollen unterschiedlich exprimiert sind.

Eine Clusteranalyse der 1.552 differentiell regulierten Transkripte in den Monozyten zeigt, dass die Anzahl der heraufregulierten Transkripte in etwa der Zahl der herunterregulierten Transkripte entspricht. Dabei handelt es sich bei den 786 heraufregulierten Transkripten um 715 unterschiedliche Gene. Die 766 herabregulierten Transkripte repräsentieren 683 Gene. Weiterhin demonstriert die Analyse, dass dieses Set an Genen dazu geeignet ist, eine klare Unterscheidung zwischen FH-Patienten und gesunden Kontrollen vorzunehmen. Eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten FH-Patienten ist jedoch nicht möglich (Abbildung 4-8a). Aus der Clusteranalyse der in T-Zellen differentiell exprimierten Gene ist zu entnehmen, dass bei FH-Patienten die Mehrzahl der Gene heraufreguliert (1999 Transkripte, welche 1839 Genen entsprechen) und nur ein geringerer Teil herabreguliert wird (445 Transkripte, welche 390 Genen entsprechen). Im Gegensatz zu den Monozyten ist hier keine vollständige Trennung zwischen FH-Patienten und Kontroll-Individuen möglich (Abbildung 4-8b).

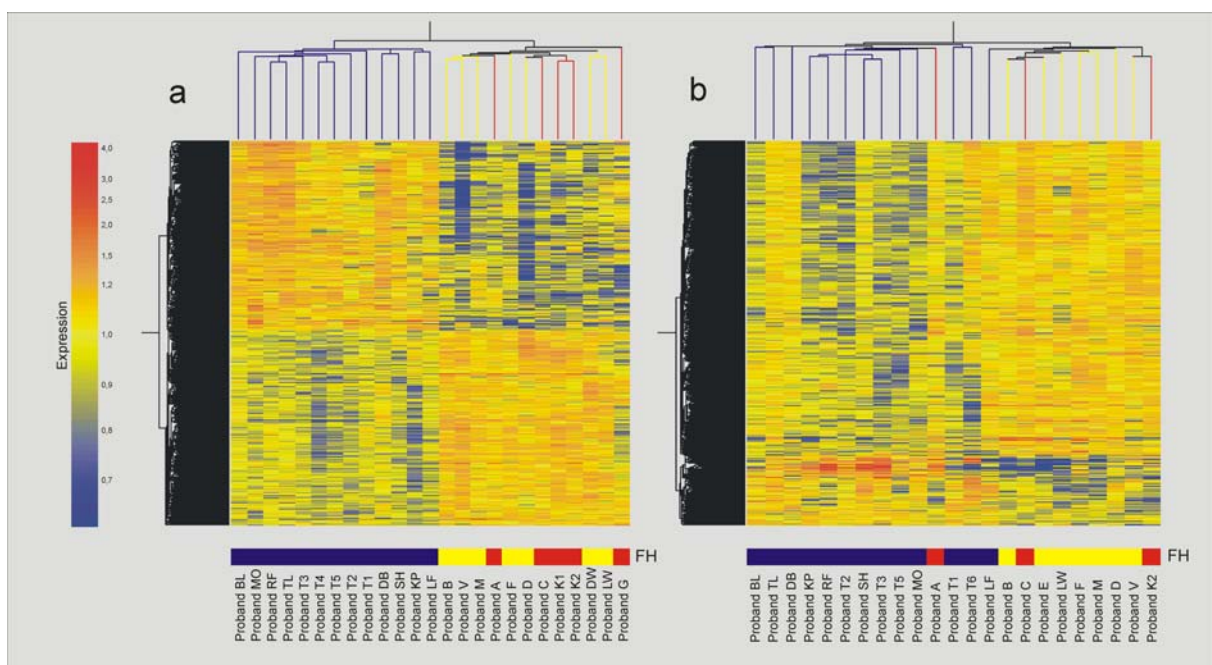


Abbildung 4-8 Hierarchische Clusteranalyse der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen FH-Patienten und Kontrollen in Monozyten und T-Zellen; a) Die Expressionsänderungen der 1.552 Transkripte, welche in Monozyten unterschiedlich exprimiert werden, sind ausreichend um eine Klassifizierung zwischen FH-Patienten und Kontrollen vorzunehmen. Die Anzahl der heraufregulierten Transkripte entspricht etwa der Anzahl der herabregulierten Transkripte. **b)** Das GEP der 2.444 in T-Zellen unterschiedlich exprimierten Transkripte ist nicht ausreichend um FH-Patienten klar von gesunden Kontrollen zu unterscheiden. In T-Zellen von FH-Patienten sind mehr Gene heraufreguliert als herabreguliert. (Rot – homozygote FH, Gelb – heterozygote FH, Blau – Kontrollen)

Die signifikant veränderten Gene in Monozyten und T-Zellen wurden anschließend mittels des internetbasierten Programms DAVID 2006 (<http://niad.abcc.ncifcrf.gov/>) einer genaueren Analyse unterzogen (227, 228). Dabei kam die Methode des „Functional GO Annotation Clustering“ (FAC) zum Einsatz. Diese Art der Analyse greift auf die Klassifizierung jedes einzelnen Gens durch das „Gene Ontology“ Konsortium zurück. Diese Klassifizierung ist in die drei Hauptklassen: Biologischer Prozess, Molekulare Funktion und Zelluläre Komponente aufgeteilt, wobei alle Hauptklassen aus zahlreichen Unterklassen bestehen. Durch diese einheitliche

Charakterisierung kann jedem Gen eine Beschreibung seiner biologischen Funktionen zugeordnet werden. Die FAC Analyse durchsucht nun eine gegebene Liste an Genen nach Gengruppen, welche darin, statistisch gesehen, überrepräsentiert sind. Anschließend fasst dieser Algorithmus die überrepräsentierten Gengruppen zu funktionellen Genclustern zusammen. Bei einem Gencluster handelt es sich daher um Gengruppen, welche funktionell miteinander im Zusammenhang stehen. Den entstandenen Genclustern werden zusätzlich so genannte „Gene Enrichment Scores“ (GES) zugeordnet. Zur Berechnung der GES wird zunächst ein Fischer Exakt T Test für die einzelnen Gengruppen berechnet, welcher eine Aussage über die Vollständigkeit dieser Gruppe gibt. Anschliessend wird aus allen p-Werten der Gengruppen ein geometrischer Mittelwert gebildet. Der GES ist dann der negative Logarithmus dieses Mittelwerts. Daher repräsentiert ein hoher GES, einen Gencluster mit funktionell eng verwandten Gengruppen, welche darüber hinaus einem hohen Besetzungsgrad aufweisen (227, 228).

Die Analysen wurden jeweils für die in FH-Patienten herauf- bzw. herabregulierten Gene durchgeführt. In Tabelle 8 sind die 3 Gencluster mit den höchsten GES pro Analyse aufgeführt. Interessanterweise werden 2 der 3 prominentesten Gencluster bei den heraufregulierten Genen in FH-Monozyten durch Gene gebildet, deren Proteine mit lysosomalem Transport und Degradation, sowie mit vesikelvermittelter Endozytose und intrazellulärem Vesikeltransport assoziiert sind. Ein weiterer Cluster wird aus Genen für Metallionen-bindende Proteine gebildet und besteht zum Großteil aus Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und Ca^{2+} -bindenden Proteinen. Innerhalb der Gruppe der herunterregulierten Gene findet sich an erster Stelle ebenfalls ein Gencluster bestehend aus Genen, welche für Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren kodieren. Die Cluster II und III werden von Genen für die Regulation des Proteintransport bzw. des Primär-Metabolismus gebildet.

In T-Zellen findet sich eine gegensätzliche Regulation. Hier sind die Gene des Primär-Metabolismus, zusammen mit den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und Genen für die ribosomale Proteinbiosynthese heraufreguliert. Gene, die für Proteine der lysosomalen Degradation kodieren, sind im Gegensatz zu den FH-Monozyten herabreguliert und weisen den höchsten GES innerhalb der herabregulierten Gencluster auf. Die sich anschliessenden beiden herabregulierten Cluster werden von Genen gebildet, deren Proteine verschiedene metabolische Prozesse inhibieren und an der Regulatoren der Apoptose beteiligt sind.

Monozyten			
Welch T Test ($p < 0.05$; Benjamini Hochberg MTC: FDR = 0.05)	FAC: GO Kategorien	Gene im Cluster	GES
786 Transkripte (715 Gene) heraufreguliert	Cluster I: lytic vacuole, lysosome	12	6,38
	Cluster II: metal ion binding, cation binding, transition metal ion binding, metal-binding, zinc ion binding, zinc, zinc-finger	149	6,33
	Cluster III: clathrin coated vesicle membrane, clathrin-coated vesicle, trans-Golgi network transport vesicle, coated pits, clathrin coat of trans-Golgi network vesicle, trans-Golgi network transport vesicle membrane, clathrin adaptor complex, endocytosis, intracellular protein transport	26	3,9
766 Transkripte (683 Gene) herunterreguliert	Cluster I: metal ion binding, zinc ion binding, zinc-finger, zinc	144	8,42

	Cluster II: protein transport, establishment of protein localization, protein transport, establishment of cellular localization, intracellular transport, intracellular protein transport, protein targeting, establishment of localization, transport	116	7,26
	Cluster III: biopolymer metabolism, primary metabolism, cellular metabolism, macromolecule metabolism, biopolymer modification, protein modification, protein metabolism, cellular protein metabolism, cellular macromolecule metabolism	314	3,15

T-Zellen

Welch T Test (p < 0.05)	FAC: GO Kategorien	Gene im Cluster	GES
1999 Transkripte (1839 Gene) heraufreguliert	Cluster I: primary metabolism, cellular metabolism, macromolecule metabolism, protein metabolism, cellular macromolecule metabolism, cellular protein metabolism, biopolymer metabolism, biopolymer modification, protein modification	816	20,27
	Cluster II: metal ion binding, cation binding, transition metal ion binding, metal-binding, zinc ion binding, zinc, zinc-finger	324	18,82
	Cluster III: cellular biosynthesis, macromolecule biosynthesis, protein biosynthesis, ribosome, protein biosynthesis, ribosomal protein, ribonucleoprotein, large ribosomal subunit	190	18,5
445 Transkripte (390 Gene) herabreguliert	Cluster I: lytic vacuole, lysosome	12	14,64
	Cluster II: regulation of cellular physiological process, negative regulation of cellular process, negative regulation of physiological process, negative regulation of cellular physiological process	71	3,11
	Cluster III: cell death, death, apoptosis, programmed cell death, regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death, negative regulation of apoptosis, negative regulation of programmed cell death, apoptosis, anti-apoptosis	23	2,43

Tabelle 8: Die Ergebnisse des „Functional Annotation Clustering“ (FAC) für differentiell exprimierte Gene in Monozyten und T-Zellen von FH- Patienten und Kontroll-Individuen

4.2.3 In FH-Monozyten sind die Gene des SREBP-Signalweges herabreguliert

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen verdeutlichen, dass aufgrund des LDL-R-Defekts Unterschiede in der Genexpression vor allem in den Monozyten und weniger in den T-Zellen vorliegen. Darüber hinaus scheinen beide Zelltypen, in unterschiedlicher Weise auf den Verlust der LDL-R-Aktivität zu reagieren. In Monozyten von FH-Patienten werden vor allem Gene für Proteine heraufreguliert, welche den Vesikeltransport von der Membran in das Lysosom steuern, wohingegen die Gene für Proteine der lysosomalen Degradation in T-Zellen herabreguliert sind. Beide Zelltypen haben prinzipiell zwei Möglichkeiten einem intrazellulären Mangel an Cholesterin aufgrund des LDL-R-Defekts entgegenzusteuern: 1) die intrazelluläre *de novo* Cholesterin-Biosynthese und 2) eine kompensatorische Heraufregulation alternativer Aufnahmesysteme für Cholesterin. Die nähere Untersuchung der GEP von Monozyten und eine anschließende Verifikation der Ergebnisse mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) bzw. Western Blot ergab, dass drei Schlüsselenzyme des SREBP Signalwegs, INSIG2, SREBF2 und SCAP in FH-

Monozyten signifikant herabreguliert sind (Abbildung 4-9 und 4-10). Im Einklang damit konnte mit qRT-PCR auch eine Herabregulation der LDL-R-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4-9). Aufgrund des begrenzten Probenmaterials konnten Western Blot-Untersuchungen nicht für alle Proteine und nur für homozygote Patienten vorgenommen werden. Zusätzlich zur Herabregulation des SREBP-Signalweges konnte auch eine niedrigere Expression des Schlüsselenzyms der *de novo* Cholesterin-Biosynthese, der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGCR), nachgewiesen werden. Ein weiteres wichtiges Protein im Cholesterin-Metabolismus stellt NPC1 dar. Dieses Protein weist gleiche Cholesterin-sensitive Domäne wie SREBF2 und HMGCR auf und ist für den retrograden lysosomalen Transport von Cholesterinestern aus LDL-Partikeln verantwortlich (246). Für NPC1 wurde ebenfalls eine Herabregulation der mRNA-Expression mittels qRT-PCR, sowie eine reduzierte Proteinexpression durch Western Blot nachgewiesen (Abbildung 4-9 und 4-10).

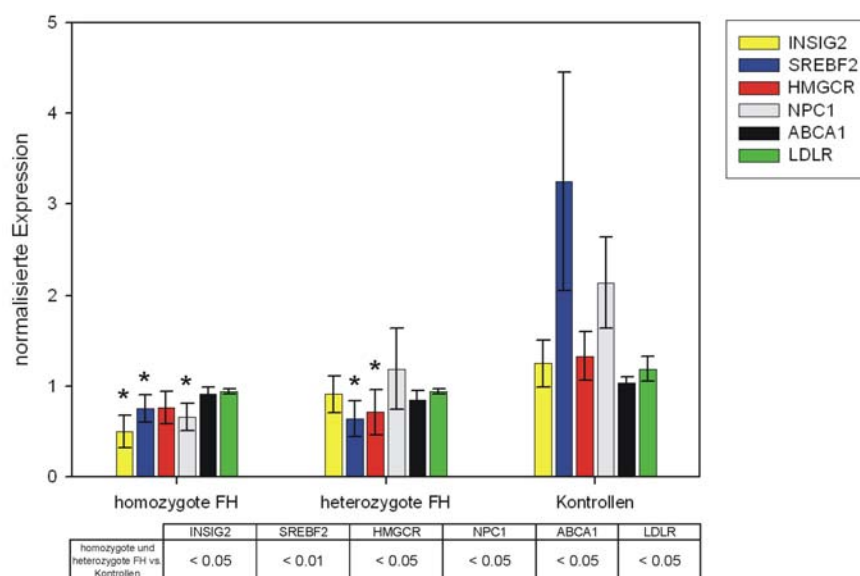


Abbildung 4-9
Verifizierung von Unterschieden in der Expression von Monozyten mittels qRT-PCR; Cholesterin-Metabolismus assoziierte Gene sind in FH-Monozyten herabreguliert (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, in der Legende unterhalb des Diagramms ist die Signifikanz der zusammengefassten homo- und heterozygoten FH-Patienten gegenüber den Kontrollen dargestellt)

Aufgrund dieser Ergebnisse, welche auf ein Überangebot an Cholesterin in FH-Monozyten hindeuten, wurde die Expression von ABCA1 überprüft. Bei ABCA1 handelt es sich um das wichtigste Cholesterin-Effluxsystem, das in Makrophagen aktiv ist. Überraschenderweise wurde auch hier eine geringe, jedoch statistisch signifikante Herabregulation der mRNA Expression in homozygoten und heterozygoten FH-Monozyten beobachtet (Abbildung 4-9). Eine Überprüfung der ABCA1-Proteinexpression im Western Blot zeigte eine deutlich erniedrigte Expression bei homozygoten FH-Monozyten im Vergleich zu Kontroll-Monozyten (Abbildung 4-10).

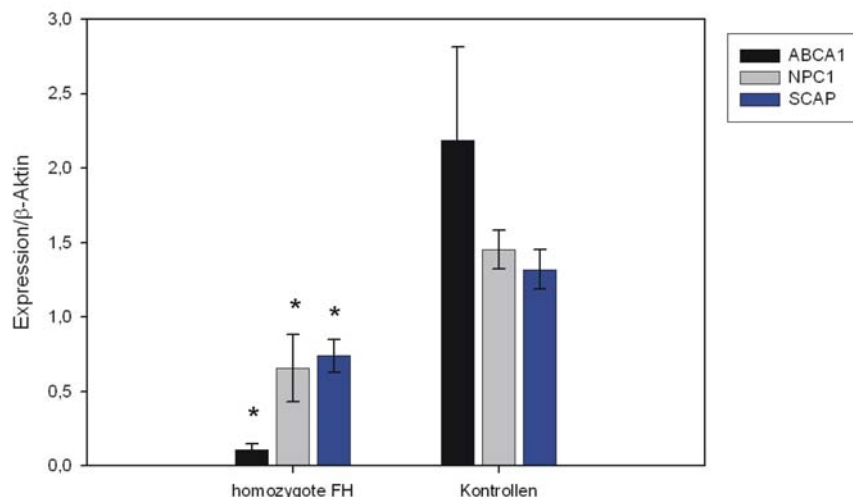


Abbildung 4-10 Western Blot Analyse der Proteinexpression von ABCA1, NPC1 und SCAP; Alle drei Proteine sind in den Cholesterin-Metabolismus eingebunden und in Monozyten von homozygoten FH-Patienten herabreguliert. Die Expression der einzelnen Proteine wurde jeweils auf die gemessene β -Aktin Expression normalisiert. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2.4 Die Gene, die für Proteine des Cholesterin-Metabolismus kodieren, sind in T-Zellen homozygoter FH-Patienten heraufreguliert.

Untersuchungen in T-Zellen ergaben eine erhöhte Expression von CD69 in homozygoten FH-Patienten (Abbildung 4-11). Bei CD69 („early T cell activation antigen“) handelt es sich um einen T Zell-Aktivierungsmarker, dessen Expression sofort nach Aktivierung von Lymphozyten stimuliert wird (247). Ebenso zeigte ACAT2 eine erhöhte Expression in homozygoten FH-T-Zellen. ACAT2 ist ein Enzym, welches die einleitenden Reaktionen der Cholesterin-Biosynthese aus Acetyl-CoA katalysiert (248). Im Gegensatz zu den FH-Monozyten wurde in homozygoten FH-T-Zellen eine erhöhte Expression des LDL-R und der HMGCR festgestellt (Abbildung 4-11). Heterozygote FH-Patienten weisen in T-Zellen keine Unterschiede in der Expression dieser Gene gegenüber den Kontrollen auf. Bei einer Untersuchung der Expression von ABCA1 in T-Zellen durch Mikroarray und qRT-PCR konnten keine Unterschiede zwischen FH-Patienten und Kontrollen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

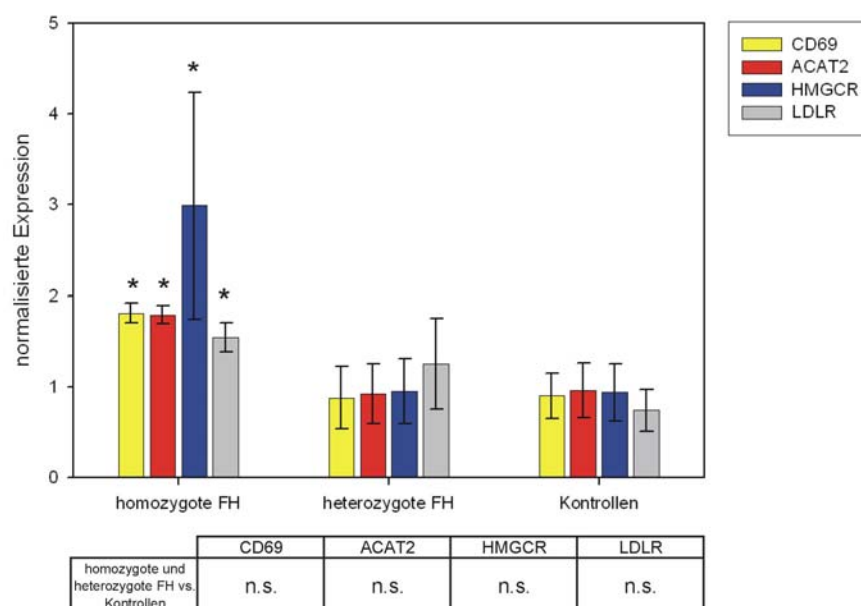


Abbildung 4-11 Verifizierung von Expressionsunterschieden in T-Zellen mittels qRT-PCR; T-Zellen von homozygoten FH-Patienten zeigen eine erhöhte Expression des T-Zellaktivierungsmarkers CD69. Im Gegensatz zu Monozyten werden Gene des Cholesterin-Metabolismus (ACAT2, HMGCR und LDL-R) in homozygoten FH-T-Zellen, verglichen mit den Kontrollen, verstärkt exprimiert. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, in der Legende unterhalb des Diagramms ist die

Signifikanz der zusammengefassten homo- und heterozygoten FH-Patienten gegenüber den Kontrollen dargestellt)

4.2.5 Einfluss einer Statin-Therapie auf die HMGCR-Expression

Die HMG-CoA-Reduktase ist das Ziel-Enzym einer Statin-Therapie, welche die Senkung der Serum-LDL-Werte zum Ziel hat. Da eine solche Statin-Therapie häufig bei der Behandlung von homo- und heterozygoten FH-Patienten eingesetzt wird, wurde nach möglichen Auswirkungen dieser Medikamente auf die Expression von HMGCR und der anderen hier beschriebenen Gene gesucht. Die Patienten wurden in 5 Gruppen eingeteilt (homo- bzw. heterozygote FH mit und ohne Statin-Therapie sowie Kontrollen) und die HMGCR-Expression in Monozyten und T-Zellen analysiert (Abbildung 4-12). Sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten FH-Patienten hat die Statin-Therapie eine Senkung der HMGCR-Expression zur Folge. Es zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen Monozyten und T-Zellen. In Monozyten ist die Expression der HMGCR sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten FH-Patienten ohne Statin-Therapie im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erniedrigt (Abbildung 4-12a). Im Gegensatz dazu weisen die T-Zellen homozygoter Patienten ohne Statin-Therapie eine deutlich erhöhte HMGCR-Expression gegenüber den Kontrollen auf. Diese wird jedoch durch Statin-Therapie auf das Niveau der Kontrollen gesenkt. Heterozygote FH-T-Zellen verfügen ohne Statin-Behandlung über eine vergleichbare Expression der HMGCR wie die Kontroll-T-Zellen. Durch Gabe von Statinen wird diese sehr deutlich unter das Niveau der Kontrollen gesenkt (Abbildung 4-12b). Abgesehen von der HMGCR-Expression, konnten keine weiteren Effekte der Statin-Therapie auf die Expression der hier untersuchten Gene bzw. Proteine in Monozyten oder T-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

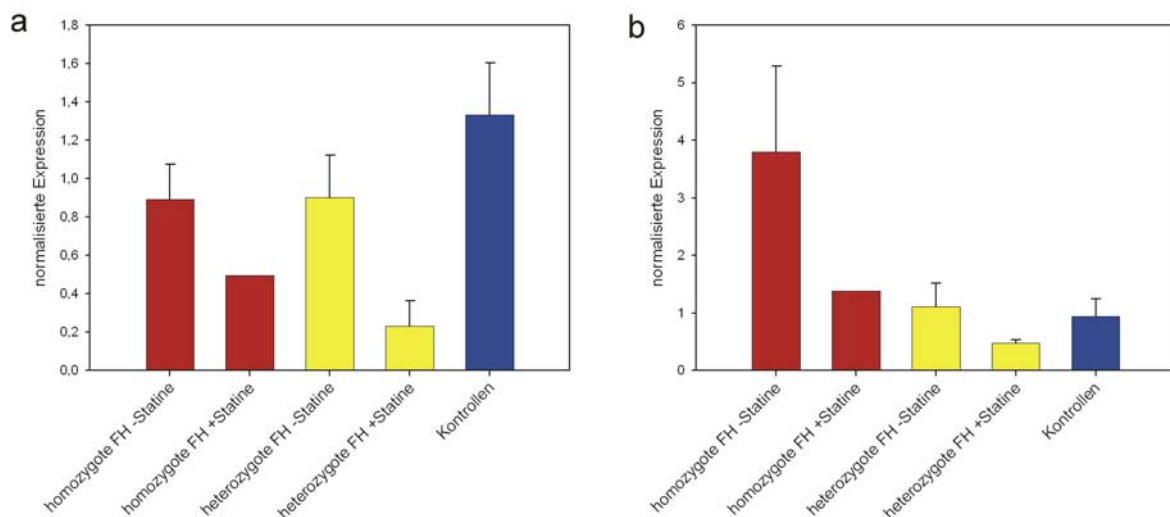


Abbildung 4-12 Der Einfluss einer Statin-Therapie auf die mRNA Expression von HMGCR (qRT-PCR); a) In Monozyten von FH-Patienten ist die Expression von HMGCR bei Patienten ohne Statin Therapie herabreguliert, die Gabe von Statinen führt additiv zu einer weiteren Senkung der HMGCR Expression. **b)** In T-Zellen von homozygoten FH-Patienten ist die HMGCR Expression ohne Statin Therapie heraufreguliert. Die Gabe von Statinen führt zu einer Reduktion der HMGCR Expression auf ein Niveau, welches mit dem von heterozygoten FH-Patienten ohne Statin Therapie und den Kontrollen vergleichbar ist. Heterozygote FH-Patienten mit Statin Therapie haben verglichen mit den Kontrollen in T-Zellen eine niedrigere HMGCR Expression. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2.6 Monozyten homozygoter und heterozygoter FH-Patienten zeigen eine erhöhte Expression von Scavenger Rezeptoren

Die gezeigten Daten demonstrieren klar, dass FH-Monozyten und T-Zellen in unterschiedlicher Weise auf den Defekt des LDL-R reagieren. Bei Monozyten ist die Cholesterin-Biosynthese wie auch der LDL-R-Signalweg sowohl in homo- als auch in heterozygoten Patienten herabreguliert. Dies deutet auf einen alternativen Aufnahmeweg für Cholesterin in FH-Monozyten hin. In T-Zellen gibt es den gegenteiligen Effekt. In diesen Zellen konnte ein Anschalten der zelleigenen Cholesterin-Biosynthese und eine Heraufregulation der LDL-R Expression beobachtet werden. Beide Befunde deuten auf eine Cholesterinmangel-Situation hin. Der Umstand, dass diese Effekte nur in homozygoten Patienten beobachtet wurden, kann durch das Verbleiben eines gesunden Allels des LDL-R erklärt werden, welches ausreichend scheint, den Cholesterinbedarf heterozygoter FH-T-Zellen zu decken.

Es stellt sich die Frage, weshalb beide Zelltypen unterschiedliche Strategien wählen, um den Problemen des LDL-R Defekts zu begegnen. Die Analyse der GEP von Monozyten zeigte, dass Gene für den Vesikeltransport, Endozytose und die lysosomale Degradation in FH-Patienten überproportional heraufreguliert sind (Tabelle 6). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass im Fall der Monozyten LDL-Aufnahmemechanismen existieren, welche kompensatorisch dem LDL-R-Defekt entgegenwirken. Eine Analyse der GEP der Monozyten zeigte eine erhöhte Expression der Scavenger-Rezeptoren CD36, CD68, CD91/LRP1 und STAB1 in Monozyten von homozygoten als auch heterozygoten FH-Patienten (Abbildung 4-13a). Die erhöhte mRNA-Expression für CD36 und STAB1 wurde mittels qRT-PCR verifiziert (Abbildung 4-13b).

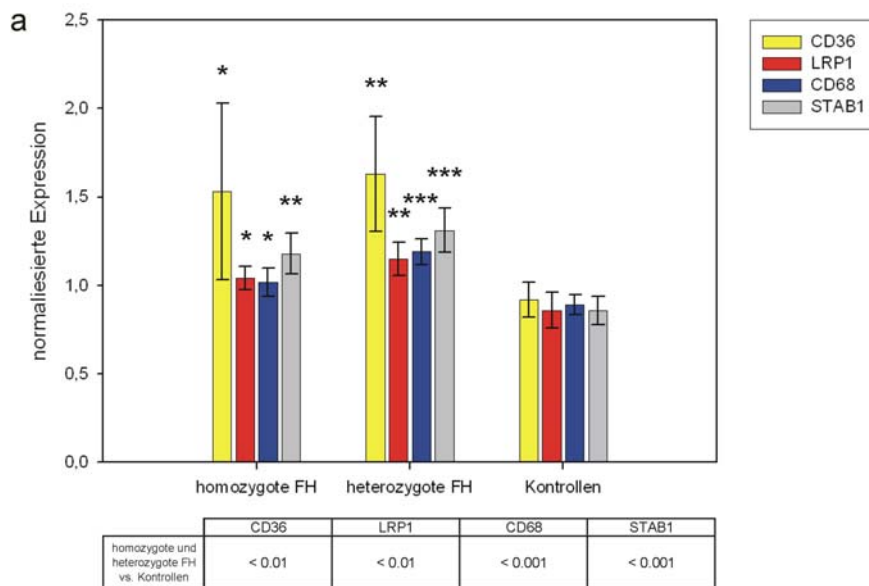
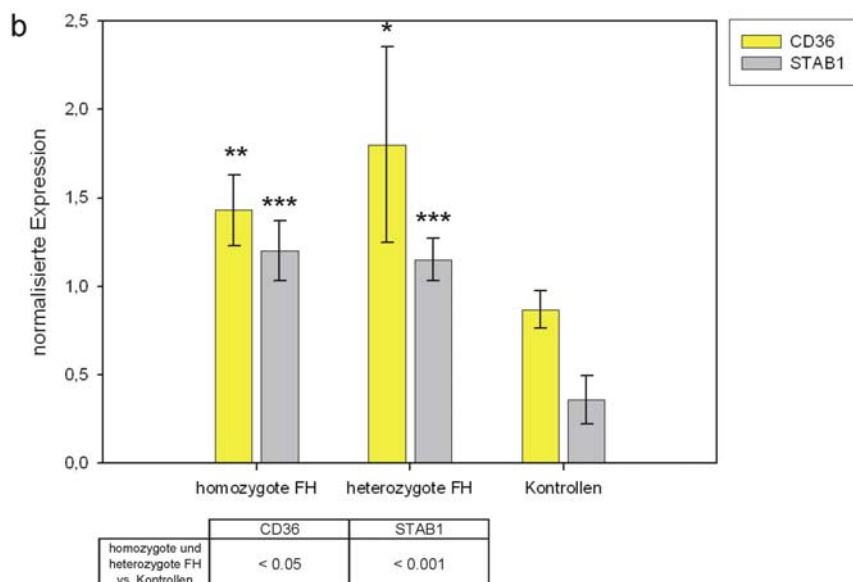


Abbildung 4-13
Erhöhte Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LRP1, CD68 und STAB1 in Monozyten von FH-Patienten; a) Die Microarray Daten zeigen eine erhöhte Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LRP1, CD68 und STAB1. **b)** Verifizierung der erhöhten Expression von CD36 und STAB1 in FH-Monozyten mittels qRT-PCR. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, in der Legende unterhalb des Diagramms ist die Signifikanz der zusammengefassten homo- und heterozygoten FH-Patienten gegenüber den Kontrollen dargestellt)



Unter Zuhilfenahme der Durchflußzytometrie wurde die Expression der Scavenger Rezeptoren auf Monozyten gemessen. Dabei wurden zwei Gruppen von Monozyten, die $CD14^+CD16^-$ und die $CD14^+CD16^+$, gesondert untersucht. Bei den $CD14^+CD16^-$ -Monozyten handelt es sich um die so genannten inflammatorischen Monozyten. Diese Population bildet den größten Anteil an der Gesamtzahl der Monozyten (zwischen 90 und 97%) und zirkuliert hauptsächlich in der Blutbahn. $CD14^+CD16^+$ -Monozyten werden auch als residente Monozyten bezeichnet. Diese Population wandert kurze Zeit nach ihrem Erscheinen in der Blutbahn in das umgebende Gewebe ein und verweilt dort um lokale Infektionen abzuwehren (249-251). Abbildung 4-14 zeigt die prinzipielle Vorgehensweise bei der Analyse dieser beiden Monozyten Populationen, am Beispiel der Expression von CD36. Zunächst wurde die Morphologie der einzelnen Zellpopulationen im forward scatter–sideward scatter-Plot (FSC-SSC) überprüft (Abbildung 4-14a). Anschliessend wurden anhand des CD14-PE/Cy5 Signals die Monozyten, welche mit CD14-PE/Cy5 Antikörpern markiert waren, aus der Gesamtheit der PBMCs herausgefiltert (Abbildung 4-14b, c) und

anschließend in CD16 positive (CD16⁺) und CD16 negative (CD16⁻) Monozyten unterteilt (Abbildung 4-14d). Danach konnte eine getrennte Auswertung der Oberflächenexpression verschiedener Proteine erfolgen (Abbildung 4-14e).

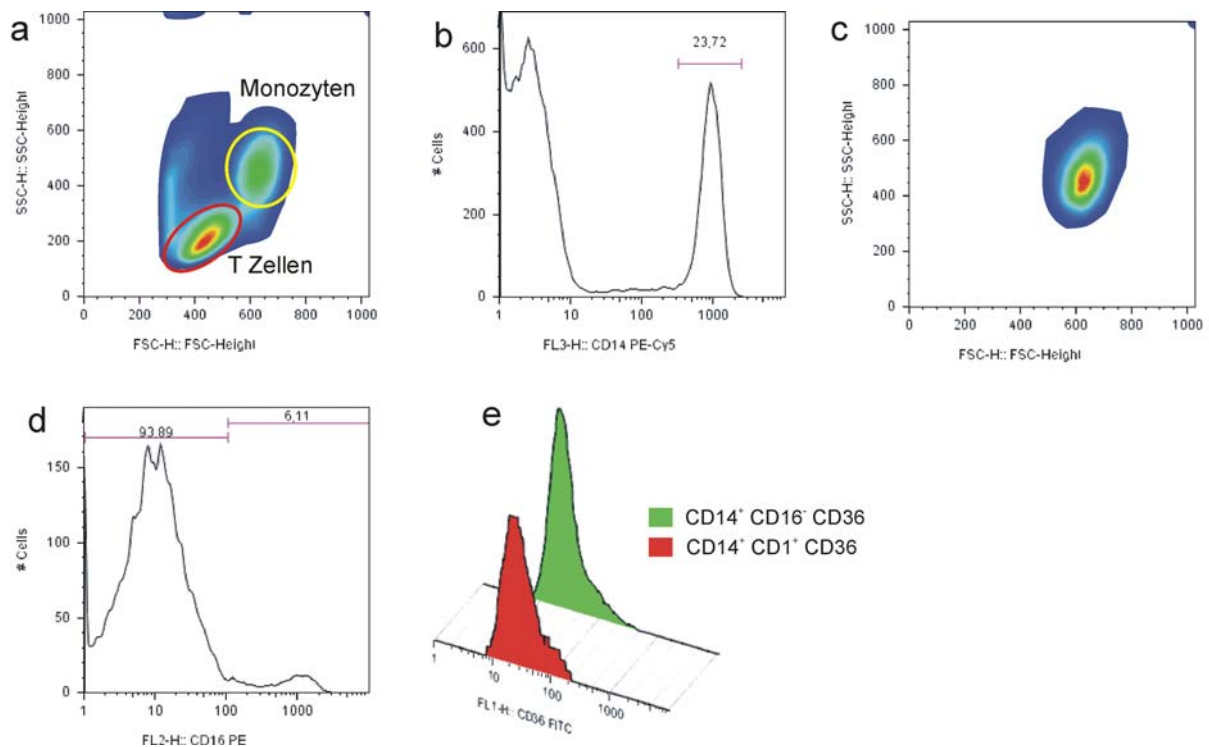


Abbildung 4-14 Die Vorgehensweise bei der Ermittlung der Oberflächenexpression von Proteinen auf den CD14⁺CD16⁻ und CD14⁺CD16⁺-Monozyten-Subpopulationen am Beispiel von CD36; a) Überprüfung der Morphologie der PBMC Populationen; **b)** filtern der CD14 positiven Zellen (Monozyten) und **c)** Überprüfung ihrer Morphologie im FSC-SSC Plot; **d)** Trennung der CD14 positiven Population in CD16 negative und CD16 positive Monozyten; **e)** Ermittlung der Subtyp spezifischen Oberflächenexpression

Die Auswertung der zytometrischen Daten bestätigte, dass CD36 und CD91/LRP1 auch auf Proteinebene in Monozyten von homozygoten und heterozygoten FH Patienten stärker exprimiert wird als auf Kontroll-Monozyten (Abbildung 4-15).

Die Expression von CD68 und STAB1 wurde sowohl extrazellulär als auch intrazellulär gemessen. Extrazellulär lokalisiert, ist CD68 als Scavenger Rezeptor aktiv. Lysosomal lokalisiertes CD68 ist dagegen als Differenzierungsmarker für Makrophagen und Vorläuferzellen von Dendritischen Zellen beschrieben(176). Die extrazelluläre Messung von CD68 ergab eine erhöhte Expression auf homozygoten und heterozygoten FH-Monozyten verglichen mit den Monozyten der Kontroll-Personen. Für die Messung der intrazellulären CD68- und STAB1-Expression standen leider keine Monozyten von heterozygoten Probanden zur Verfügung. Eine Messung der intrazellulären CD68-Expression, sowie der extra- und intrazellulären Expression von STAB1 an drei homozygoten FH und vier gesunden Probanden zeigte eine erhöhte extrazelluläre Expression beider Proteine, sowie eine erhöhte intrazelluläre STAB1-Expression in homozygoten FH-Patienten. Obwohl die Unterschiede zwischen FH-Patienten und Kontrollen sehr deutlich sind, wird aufgrund der geringen Probenzahl keine statistische Signifikanz erreicht (Abbildung 4-15 d, f, g). Es wurden bei keinem der untersuchten Rezeptoren Unterschiede

hinsichtlich der Expression zwischen CD14⁺CD16⁻ - und CD14⁺CD16⁺ - Monozyten festgestellt (Daten nicht gezeigt).

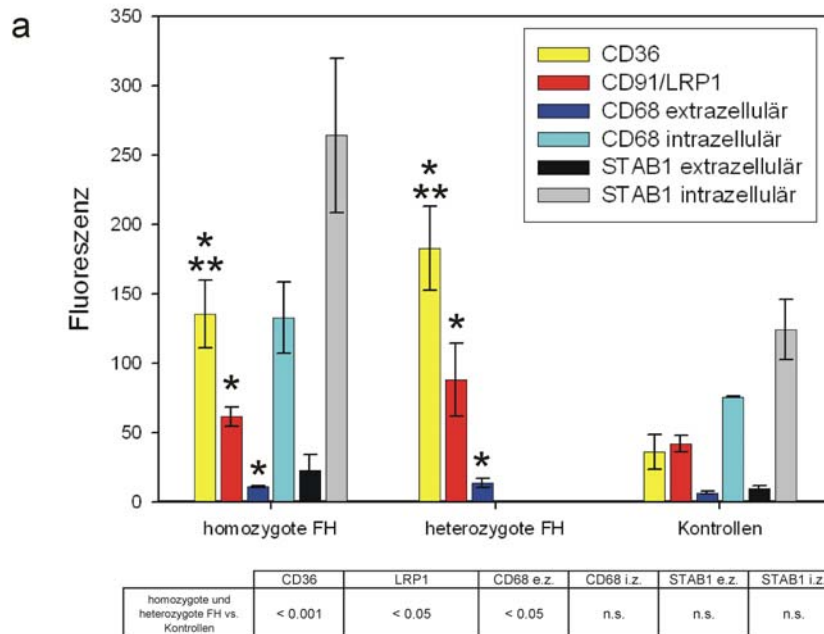
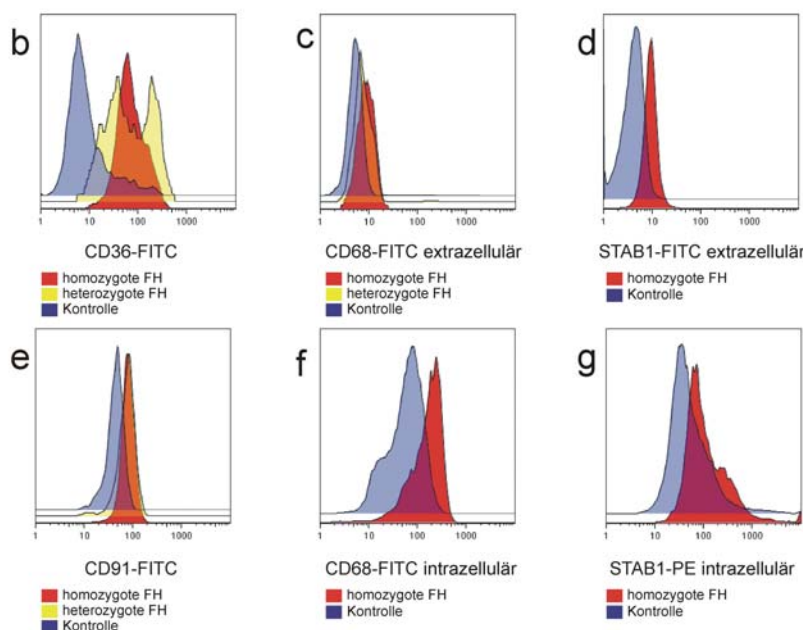


Abbildung 4-15
Verifizierung der erhöhten Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LRP1 (CD91), CD68 und STAB1 in FH-Monozyten mittels Durchflußzytometrie; a) Zusammenfassung aller Messungen durch Histogramm-Darstellung; Messung der extra-zellulären Expression von b) CD36, c) CD68, d) STAB1, e) LRP1; Messung der intrazellulären Expression von f) CD68 und g) STAB1; es sind jeweils repräsentative Messungen gezeigt (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, in der Legende unterhalb des Diagramms ist die Signifikanz der zusammengefassten homo- und heterozygoten FH-Patienten gegenüber den Kontrollen dargestellt)



Die erhöhte Expression von CD36 konnte mittels Western Blot erneut in homozygoten FH-Patienten, jedoch nicht in heterozygoten Patienten, verifiziert werden. Die Ursache hierfür ist nicht klar. Möglicherweise haben homozygote FH-Patienten einen höheren CD36 „turn over“ und daher auch einen höheren intrazellulären CD36-Anteil. In bezug auf die CD36-Oberflächenpräsentation und damit den Anteil des funktionell aktiven Proteins wurden, wie bereits gezeigt, keine Unterschiede zwischen homozygoten und heterozygoten FH-Patienten festgestellt. Für CD91/LRP1 wurde eine erhöhte Expression sowohl in homozygoten als auch in heterozygoten FH-Monozyten im Vergleich zu Kontroll-Monozyten nachgewiesen (Abbildung 4-16).

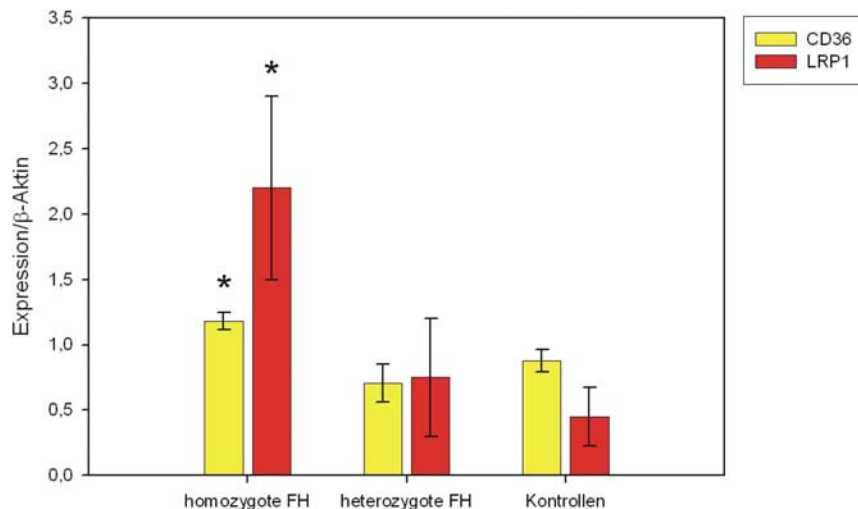


Abbildung 4-16 Western Blot Analyse der Expression von CD36 und LRP1; Nur homozygote FH-Patienten zeigen eine erhöhte Expression von CD36 und LRP1 verglichen mit den Kontrollen. Die Expression der gemessenen Proteine wurde auf die β -Aktin Expression normalisiert. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2.7 Homozygote FH-Patienten haben erhöhte Serum-oxLDL-Werte

Da CD36 und CD68 als Rezeptoren für oxLDL beschrieben wurden, sollte zunächst geklärt werden, ob es Unterschiede in der Bildung von oxLDL zwischen FH-Patienten und gesunden Kontrollen gibt (159, 252). Dazu wurden die Serum-oxLDL-Werte des Studienkollektivs mittels oxLDL-ELISA bestimmt (Abbildung 4-17). Überraschenderweise fanden sich jedoch nur bei homozygoten FH-Patienten erhöhte oxLDL-Werte. Die Werte der heterozygoten FH-Patienten waren mit denen der Kontrollprobanden vergleichbar.

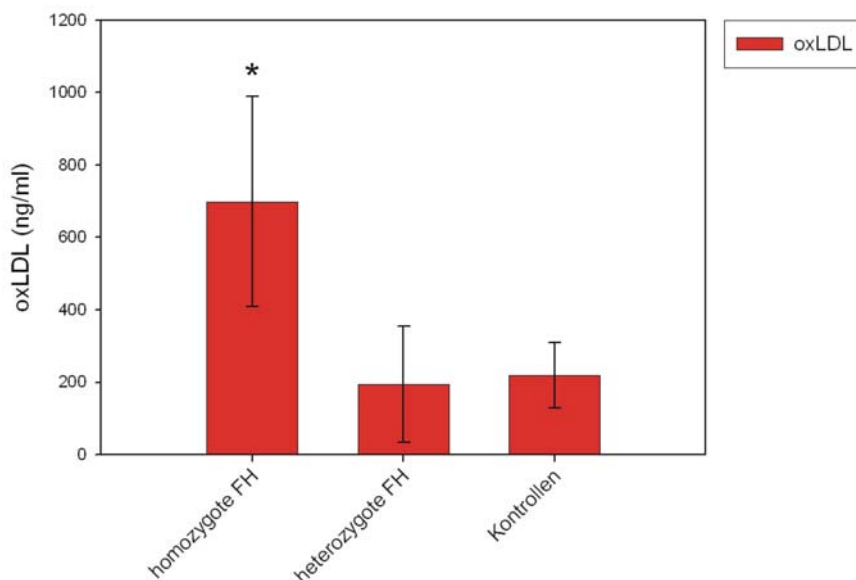


Abbildung 4-17 Serum-oxLDL Werte des untersuchten Studienkollektivs; Nur homozygote FH-Patienten weisen erhöhte Serum oxLDL Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Um die funktionelle Relevanz der erhöhten Expression der Scavenger Rezeptoren zu überprüfen, wurden mittels Durchflußzytometrie Bindungs- und Aufnahmestudien in kryokonservierten Monozyten von drei homozygoten FH-Patienten und vier gesunden Kontrollen mit fluoreszenzmarkiertem LDL durchgeführt. Dabei wurden zwei Formen von LDL, natives LDL (nLDL) und mild oxidiertes LDL (moxLDL), verwendet. Im Fall von nLDL wurde darauf geachtet, dass dieses nach seiner Präparation sofort markiert und innerhalb von einer Woche verbraucht wurde.

Hierdurch sollte sichgestellt werden, dass keine unbeabsichtigte Oxidation der nativen LDL erfolgt.

MoxLDL wurden deshalb für die Bindungs- und Aufnahmestudien gewählt, da diese Form der LDL-Modifizierung den im Körper vorkommenden modifizierten LDL sehr viel näher kommen als die oftmals experimentell genutzte stark oxidierten LDL. Dies bestätigen Ergebnisse, welche mit ELISA-Kits zur Detektion von oxLDL gewonnen wurden und kommerziell verfügbar sind. Messungen mit diesen Kits ergeben, dass ELISA-Kits mit einer niedrigeren Detektionsgrenze (<60 Malondialdehydreste/LDL Partikel) aufgrund einer höheren Sensitivität sehr viel höhere oxLDL-Werte im Serum des gleichen Patienten ergeben, als bisher erhältliche, weniger sensitive ELISA-Kits, welche nur stärker modifizierte oxLDL-Formen detektieren können (253). Dies bedeutet, dass sich weit mehr moxLDL-Partikel in der Zirkulation befinden.

4.2.8 Monozyten von homozygoten FH-Patienten nehmen verstärkt moxLDL auf.

Die Bindungsanalysen mit unterschiedlichen Konzentrationen an nLDL bzw. moxLDL bei 4°C für 1 Stunde konnten zeigen, dass FH-Monozyten eine stärkere Bindungskapazität für moxLDL als Kontroll-Monozyten aufweisen. Die Bindung von nLDL war bei FH-Monozyten überraschenderweise mit der von Kontroll-Monozyten vergleichbar. Da die hier untersuchten homozygoten FH-Patienten aber alle einen Defekt in der Bindungsstelle des LDL-R für ApoB aufweisen (W556R bzw. C88R und D333G), bedeutet dieser Befund, dass FH-Monozyten im Gegensatz zu Fibroblasten von FH-Patienten trotz eines LDL-R-Bindungsdefekts in der Lage sind, nLDL zu binden (Abbildung 4-18).

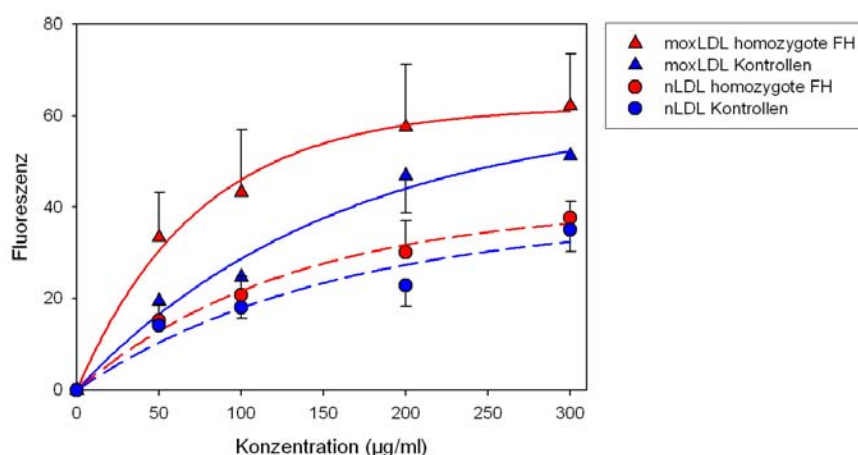


Abbildung 4-18 Messung der dosisabhängigen Bindung von moxLDL und nLDL (1 Stunde, 4°C); Monozyten von homozygoten FH-Patienten haben eine höhere Bindungskapazität für moxLDL im Vergleich zu den Kontroll-Monozyten. Die Bindung von nLDL ist zwischen beiden Monozytentypen vergleichbar.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der dosisabhängigen Aufnahme gemacht. Hier wurden kryokonservierte Monozyten mit steigenden Konzentrationen (25 – 200 µg/ml) an markierten moxLDL und nLDL für 1h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die spezifische Aufnahme gemessen. Auch hier wiesen FH-Monozyten eine deutlich höhere Aufnahme von moxLDL im Vergleich zu den Kontrollen auf. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs zeichnet sich zudem eine andere Aufnahmekinetik für moxLDL zwischen FH-Monozyten und Kontrollen ab. In Hinblick auf die Aufnahme von nLDL gibt es keine Unterschiede bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml. Bei Konzentrationen ab 150 µg/ml war die nLDL-Aufnahme bei FH-Monozyten sogar höher als bei den Kontrollen (Abbildung 4-19).

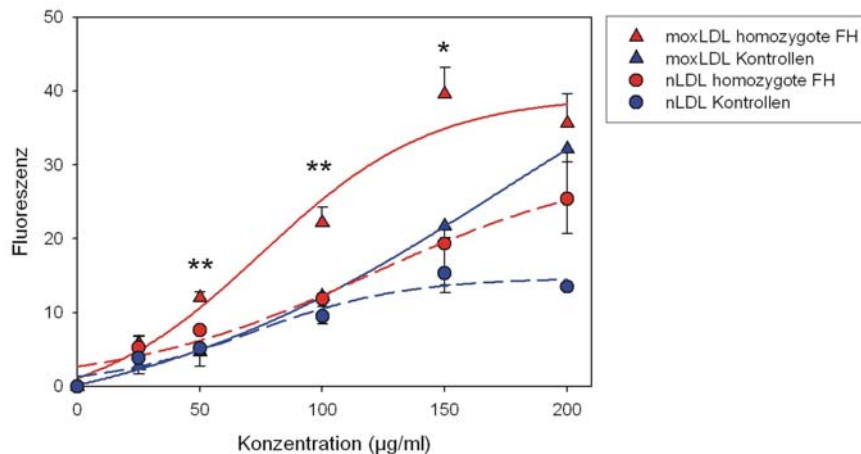


Abbildung 4-19 Messung der dosisabhängigen Aufnahme von moxLDL und nLDL (1 Stunde, 37°C); Homozygote FH-Monozyten nehmen mehr moxLDL als die Kontrollmonozyten auf. nLDL wird von homozygoten FH-Monozyten und Kontroll-Monozyten in gleichem Umfang aufgenommen. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

In einer Untersuchung der zeitabhängigen Aufnahme von moxLDL und nLDL konnte die erhöhte moxLDL-Aufnahme durch FH-Monozyten nochmals bestätigt werden. Wie in den vorangegangenen Experimenten konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme von nLDL zwischen FH-Monozyten und Kontroll-Monozyten festgestellt werden (Abbildung 4-20).

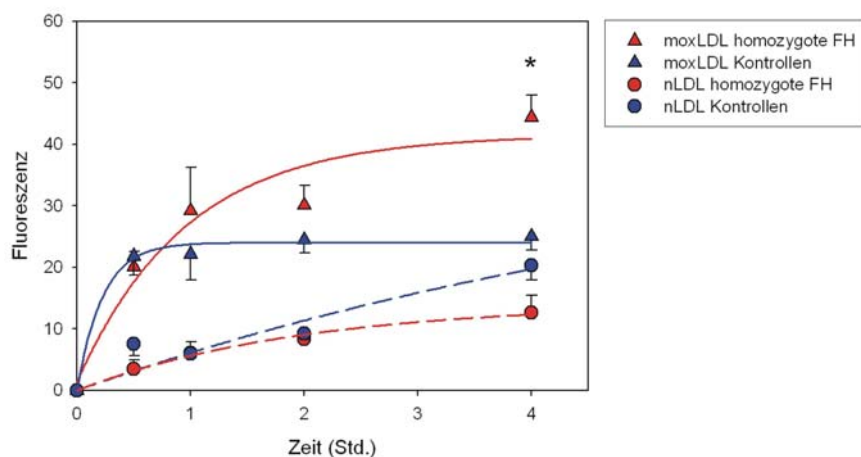


Abbildung 4-20 Messung der zeitabhängigen Aufnahme von moxLDL und nLDL (100µg/ml moxLDL bzw. nLDL, 37°C); Monozyten von homozygoten FH-Patienten nehmen mehr moxLDL als Kontrollen auf. Die Aufnahme von nLDL ist auch hier zwischen FH-Monozyten und Kontrollen vergleichbar. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2.9 Die vermehrte moxLDL Aufnahme durch homozygote FH-Monozyten führt zu einem Anstieg der Gesamtzahl an apoptotischen und toten Zellen

Wie bereits erwähnt, können oxLDL zytotoxisch wirken und Apoptose induzieren. Es sollte daher geklärt werden, ob dieser Effekt auch bei der Aufnahme von moxLDL durch FH-Monozyten und Kontroll-Monozyten auftritt.

Monozyten von FH-Patienten und gesunden Kontrollen wurden 4 Stunden mit moxLDL bzw. nLDL bei 37°C inkubiert und mit 7AAD, einem spezifischen Farbstoff zur Markierung toter Zellen, gefärbt. Es zeigte sich, dass nach Inkubation mit moxLDL als auch mit nLDL, die Zahl der toten Zellen steigt. Dieser Effekt ist bei Inkubation mit moxLDL jedoch stärker ausgeprägt als bei nLDL. Ein Vergleich der Gesamtfluoreszenz nach der Inkubation mit moxLDL offenbart zudem einen signifikant erhöhten Anteil toter Zellen an FH-Monozyten gegenüber den Kontroll-Monozyten (Abbildung 4-21).

Die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen durch AnnexinV-Färbung zeigt, dass sowohl bei der Inkubation mit moxLDL als auch nLDL ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellen erfolgt. Diese Beobachtung kann bei FH-Monozyten als auch bei Kontroll-Monozyten gemacht werden. Auch hier induziert oxLDL eine höhere Apoptose-Rate in FH-Monozyten im Vergleich zu den Kontroll-Monozyten. Zudem induziert auch nLDL in FH Monozyten vermehrt Apoptose verglichen gegenüber Kontroll-Monozyten (Abbildung 4-22).

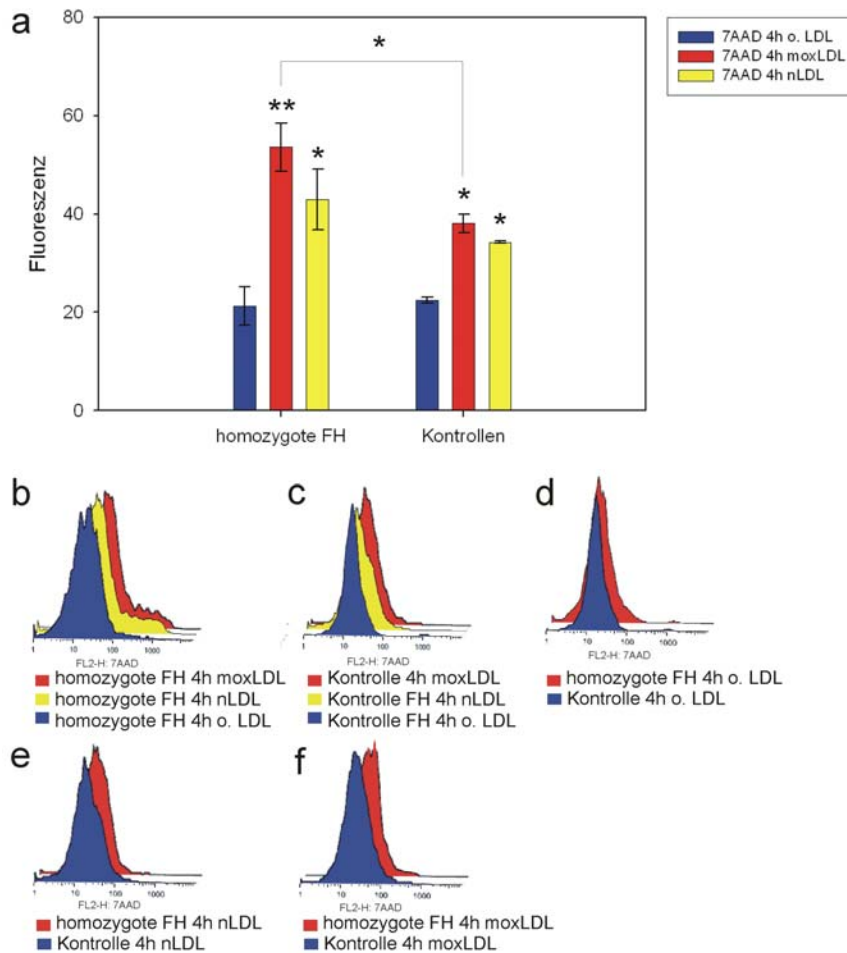
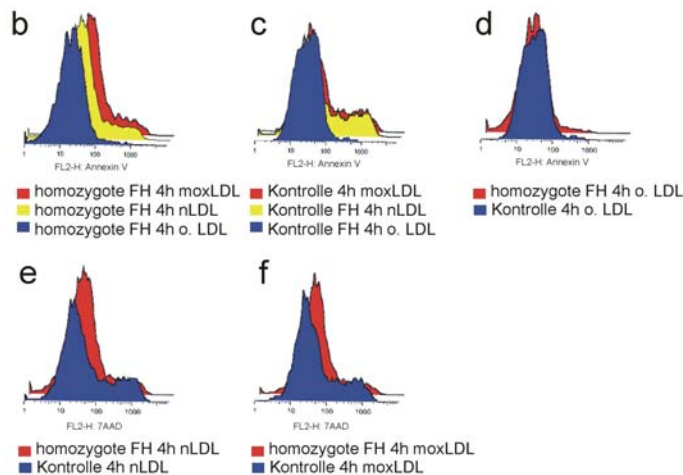
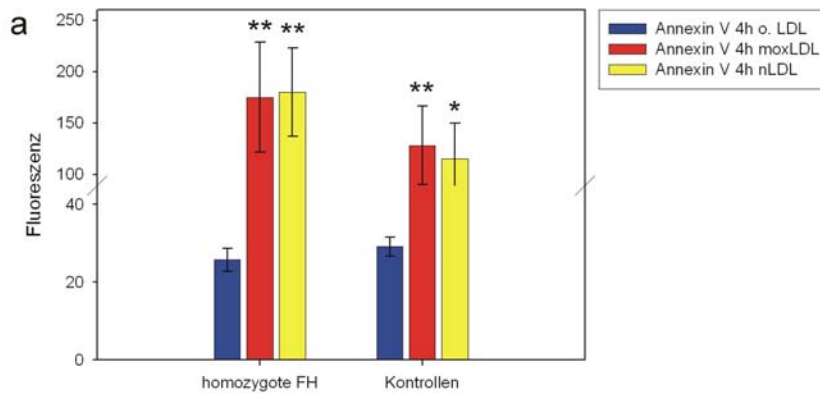


Abbildung 4-21 Messung des Anteils an toten Zellen nach 4 Stunden Inkubation mit moxLDL bzw. nLDL durch 7AAD Markierung und Durchflußzytometrie;

Sowohl moxLDL als auch nLDL führt in FH-Monozyten und Kontroll-Monozyten zu einem Anstieg der Gesamtmenge an toten Zellen. Die Inkubation mit moxLDL führt zu einem größeren Anteil an toten Zellen in beiden Monozytentypen verglichen mit Monozyten, welche ohne LDL bzw. mit nLDL inkubiert wurden. Der Anteil der toten Zellen infolge der moxLDL Inkubation ist bei FH-Monozyten verglichen mit Kontroll-Monozyten höher. **a)** Zusammenfassung aller Messungen, **b)** Gegenüberstellung der Effekte von moxLDL, nLDL und ohne LDL Zugabe bei bei homozygoten FH-

Monozyten (repräsentative Messungen). **c)** Gegenüberstellung der Effekte von moxLDL, nLDL und ohne LDL Zugabe bei Kontroll-Monozyten (repräsentative Messungen). **d)** Messungen ohne LDL Zugabe, **e)** mit nLDL, **f)** moxLDL; (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)



p<0,01, *** p<0,001)

Abbildung 4-22 Messung des Anteils apoptotischer Zellen nach 4 Stunden Inkubation mit moxLDL bzw. nLDL durch Annexin V Markierung und Durchflußzytometrie; die Inkubation mit moxLDL bzw. nLDL führt sowohl bei FH-Monozyten wie auch bei Kontroll-Monozyten zu einem Anstieg der Gesamtmenge apoptotischer Zellen; **a)** Zusammenfassung aller Messungen, **b)** Gegenüberstellung der Effekte von moxLDL, nLDL und ohne LDL Zugabe bei homozygoten FH-Monozyten (repräsentative Messungen) **c)** Gegenüberstellung der Effekte von moxLDL, nLDL und ohne LDL Zugabe bei Kontroll-Monozyten (repräsentative Messungen). **d)** Messungen ohne LDL Zugabe, **e)** mit nLDL, **f)** moxLDL ;(* p<0,05, **

4.2.10 CD36 ist der Hauptrezeptor für die Aufnahme von moxLDL in Monozyten

Da CD36 der Rezeptor mit den deutlichsten Unterschieden in der Expression zwischen FH-Monozyten und Kontroll-Monozyten ist, sollte geklärt werden, in welchem Umfang dieser an der Aufnahme von moxLDL bzw. nLDL beteiligt ist. Dazu wurden sowohl FH-Monozyten als auch Kontroll-Monozyten mit einem CD36 spezifischen Antikörper (FA6-152) inkubiert. Dieser Antikörper inhibiert in der von uns verwendeten Konzentration spezifisch die CD36-Rezeptorfunktion (254). Soweit bekannt, hat er keinen Einfluss auf die Funktion weiterer Rezeptoren. Nach vorausgegangener Inkubation mit FA6-152 wurden die Monozyten 4 Stunden mit 100µg/ml moxLDL bzw. nLDL inkubiert. Es zeigte sich, dass die Blockade von CD36, sowohl in FH-Monozyten als auch in gesunden Monozyten, eine etwa 50%ige Reduktion der Gesamtaufnahme von moxLDL zur Folge hat. Die Aufnahme von moxLDL war jedoch trotz der CD36-Blockade in FH-Monozyten signifikant höher als in gesunden Monozyten (Abbildung 4-23). Dieses Ergebnis demonstriert, dass CD36 den größten Anteil an der erhöhten moxLDL-Aufnahme durch FH-Monozyten vermittelt und als potentielles Ziel für Pharmaka zur Therapie von Atherosklerose dienen könnte.

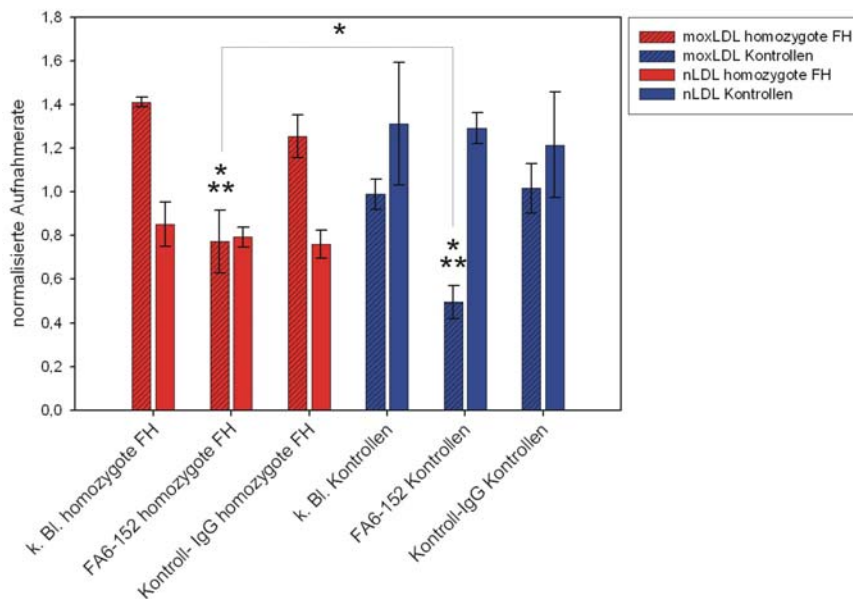


Abbildung 4-23
Inhibierung der CD36
Rezeptorfunktion mit
dem CD36-spezifischen
Antikörper FA6-152;
 Durch die Blockade von CD36 wird die Aufnahme von moxLDL in FH-Monozyten wie Kontroll-Monozyten um etwa 50% reduziert. Die moxLDL Aufnahme ist jedoch auch nach der Blockade von CD36 in FH-Monozyten höher als in Kontroll-Monozyten. Eine Inhibierung von CD36 hat keinen Einfluss auf die Aufnahme von nLDL. Die Messwerte für Aufnahme von moxLDL und nLDL

durch FH-Monozyten bzw. Kontroll-Monozyten wurden zur besseren Illustration des Effekts der CD36 Blockade jeweils auf den Median der Gesamt-Messergebnisse für jeden einzelnen Probanden normiert. (k.Bl. – keine Blockade) (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

4.2.11 FH-Patienten weisen eine reduzierte Gesamtzahl an CD16⁺ Monozyten auf.

Es sollte nun geklärt werden, ob die beobachteten Effekte aus der Zellkultur auch *in vivo* von Bedeutung sind. Ein indirekter Hinweis darauf wurde durch die Bestimmung des Anteils von CD14⁺CD16⁺-Monozyten an der Gesamtmenge der Monozyten bei FH-Patienten gewonnen. Von dieser Monozyten-Subpopulation ist bekannt, dass sie eine besondere Präferenz für die Aufnahme von oxLDL aufweist, wobei die oxLDL Aufnahme in diesem Zelltyp zum Teil über CD36 vermittelt wird (255). Eine Messung der Gesamtmenge an CD14⁺CD16⁺-Monozyten ergab, dass FH-Patienten einen niedrigeren Anteil dieser Zellen in der Zirkulation aufweisen (Abbildung 4-24). Da eine erhöhte Apoptose-Rate durch oxLDL-Aufnahme in FH-Monozyten gezeigt werden konnte und zusätzlich homozygote FH-Patienten einen erhöhten Serum-oxLDL-Wert aufweisen, könnte eine verstärkte Apoptose-Rate dieser Monozyten eine Erklärung für den niedrigeren CD14⁺CD16⁺ Monozyten-Anteil bei FH-Patienten sein.

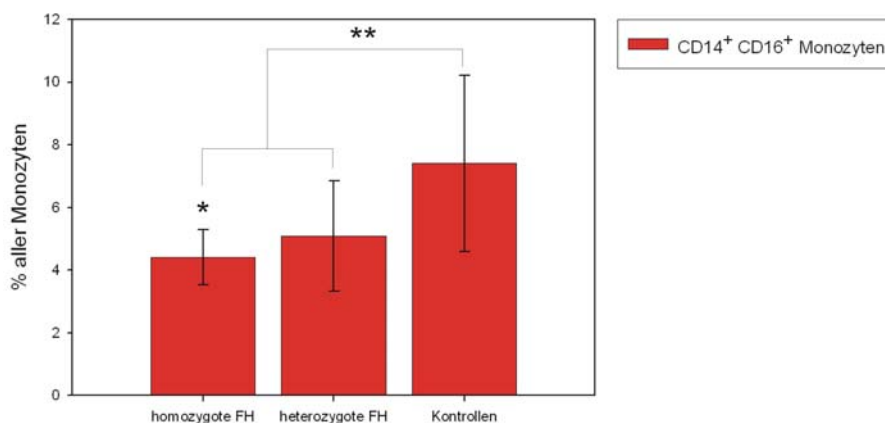


Abbildung 4-24 FH-Patienten haben einen niedrigeren prozentualen Anteil an CD14⁺CD16⁺ Monozyten gegenüber den Kontrollen. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

4.2.12 Monozyten von FH-Patienten präsentieren auf ihrer Zelloberfläche vermehrt Adhäsionsmoleküle und weisen DC-Differenzierungsmerkmale auf.

Bei der Entstehung von Atherosklerose ist die Interaktion der Leukozyten mit der endothelialen Zellwand von besonderer Bedeutung. Ein Adhäsionsprotein, welches infolge von oxLDL-Stimulation in Monozyten vermehrt exprimiert wird und die Bindung von Monozyten an Endothelzellen vermittelt, ist ITGB1 (123). Eine Analyse der GEP von Monozyten zeigte eine erhöhte Expression von CD29/ITGB1 in FH-Monozyten. Diese Beobachtung konnte durch qRT-PCR verifiziert werden (Abbildung 4-25).

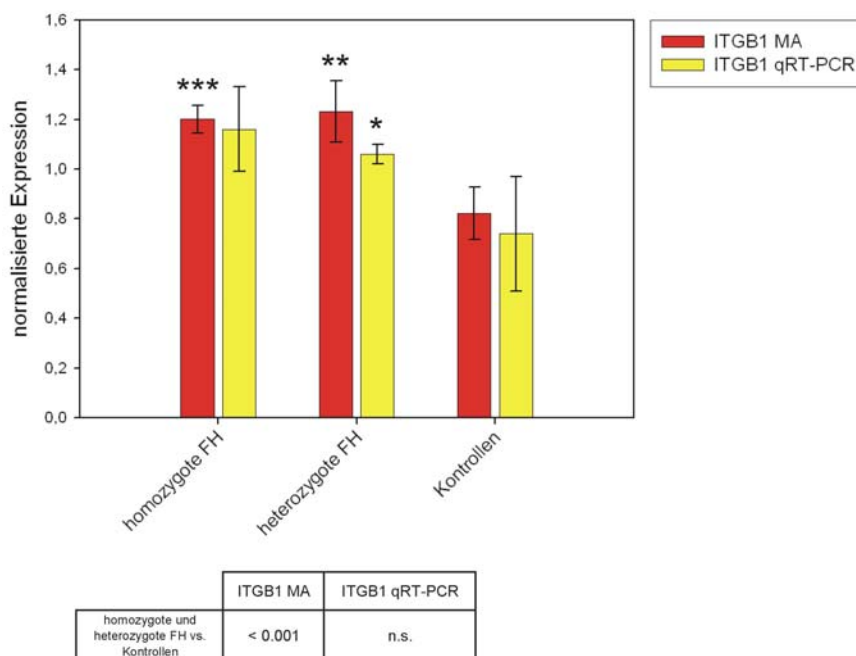


Abbildung 4-25
Erhöhte Expression von ITGB1/CD29 in FH-Monozyten; Die Microarray-Messungen (MA) und die Verifizierung mittels qRT-PCR zeigen eine erhöhte Expression von ITGB1 in Monozyten von FH-Patienten gegenüber den Kontroll-Monozyten. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, in der Legende unterhalb des Diagramms ist die Signifikanz der zusammengefassten homo- und heterozygoten FH-Patienten gegenüber den Kontrollen dargestellt)

Unter Zuhilfenahme der Durchflußzytometrie konnte sowohl auf $CD14^+CD16^-$ als auch auf $CD14^+CD16^+$ Monozyten eine erhöhte CD29/ITGB1-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4-26). Auf der Zelloberfläche von $CD14^+CD16^+$ Monozyten, jedoch nicht auf $CD16^-$ Monozyten von FH-Patienten, konnte zudem eine verstärkte Expression von CD11c nachgewiesen werden (Abbildung 4-26). Bei CD11c handelt es sich um ein Protein, welches die Adhäsion von Monozyten an endotheliale Zellen vermittelt und bei der Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen exprimiert wird (251, 256, 257). Aufgrund der Vermutung, dass Dendritische Zellen vor allem aus $CD14^+CD16^+$ -Monozyten hervorgehen, kann der reduzierte Anteil an $CD14^+CD16^+$ -Monozyten bei FH-Patienten zusätzlich durch ein verstärktes Umdifferenzieren und Abwandern dieser Monozyten-Subpopulation aus der Zirkulation erklärt werden (84, 250).

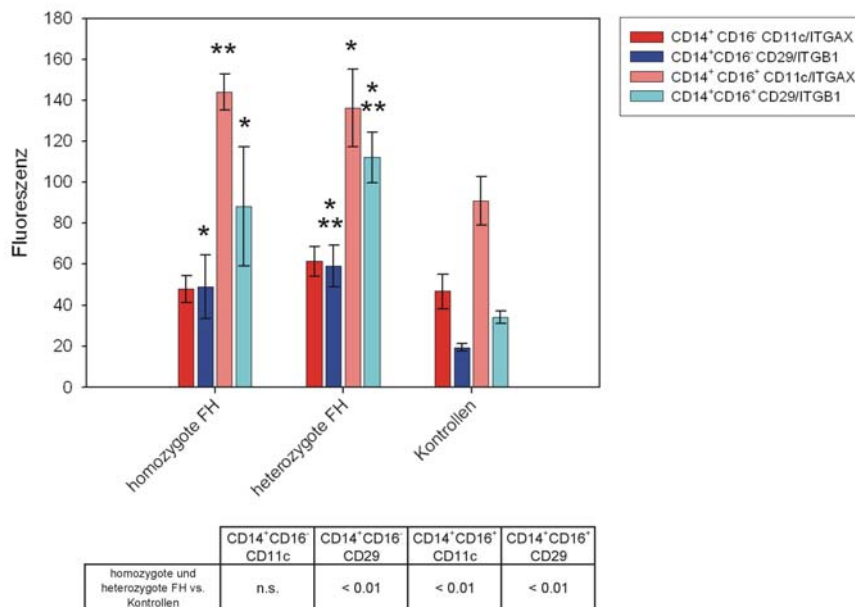


Abbildung 4-26
Messung der Expression von CD26/ITGB1 und CD11c/ITGAX auf CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten;
 CD29 wird bei FH-Patienten auf beiden untersuchten Monozytenpopulationen stärker exprimiert verglichen mit den Kontroll-Monozyten. CD11c, ein Marker für Dendritische Zellen (258), wird bei FH-Patienten auf CD14⁺CD16⁺ Monozyten stärker exprimiert. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, in der Legende unterhalb des Diagramms

ist die Signifikanz der zu-sammengefassten homo- und heterozygoten FH-Patienten gegenüber den Kontrollen dargestellt)

Ein weiteres Protein, welches in Monozyten von FH-Patienten stärker exprimiert wird, ist Calreticulin (CALR). Dieses Protein ist neben seiner Funktion als Chaperon auch ein Korezeptor für LRP1 und vermutlich an der posttranslationalen Modifikation und dem Transport von ITGB1 zur Zelloberfläche beteiligt (84). Darüber hinaus dient es, zusammen mit LRP1, als Rezeptor für apoptotische Zellen bei der Phagozytose durch Monozyten und Makrophagen (83, 259, 260). Eine erhöhte Expression von CALR konnte im Mikroarray sowohl in homozygoten als auch in heterozygoten FH-Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 4-27).

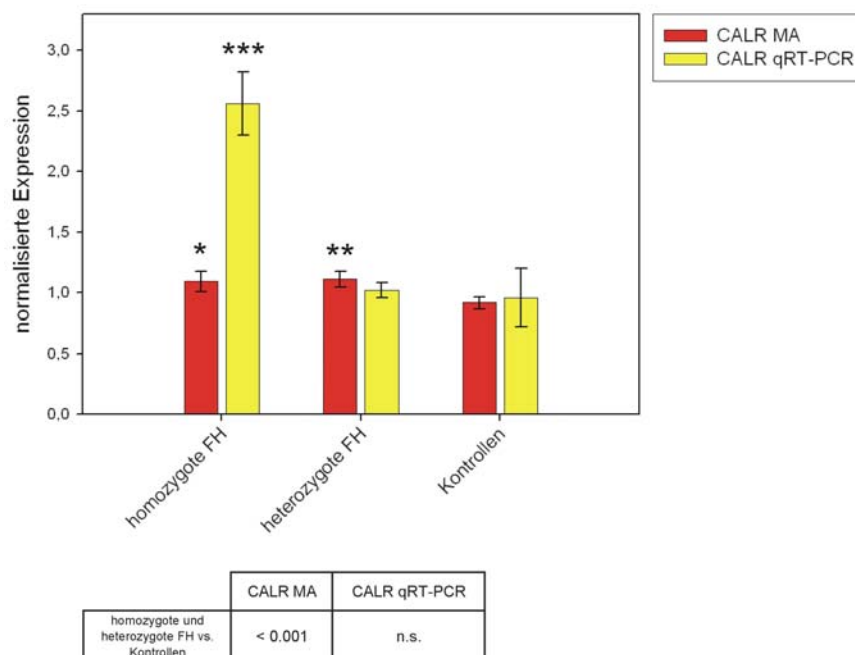


Abbildung 4-27 CALR wird in FH-Monozyten verstärkt exprimiert; Die Mikroarray Daten zeigen eine verstärkte Expression in Monozyten von homozygoten und heterozygoten FH-Patienten im Vergleich zu den Kontroll-Monozyten. Durch qRT-PCR konnte eine höhere Expression von CALR in homozygoten, jedoch nicht in heterozygoten FH-Patienten nachgewiesen werden. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, in der Legende unterhalb des Diagramms ist die Signifikanz der zu-sammengefassten homo-

und heterozygoten FH-Patienten gegenüber den Kontrollen dargestellt)

Obwohl mittels qRT-PCR eine erhöhte CALR-mRNA-Expression in heterozygoten Patienten nicht bestätigt werden konnte, war ein Nachweis einer erhöhten Expression von CALR auf Proteinebene bei Monozyten sowohl von homozygoten als auch von heterozygoten FH-Patienten durch Western Blot Analyse erfolgreich (Abbildung 4-28).

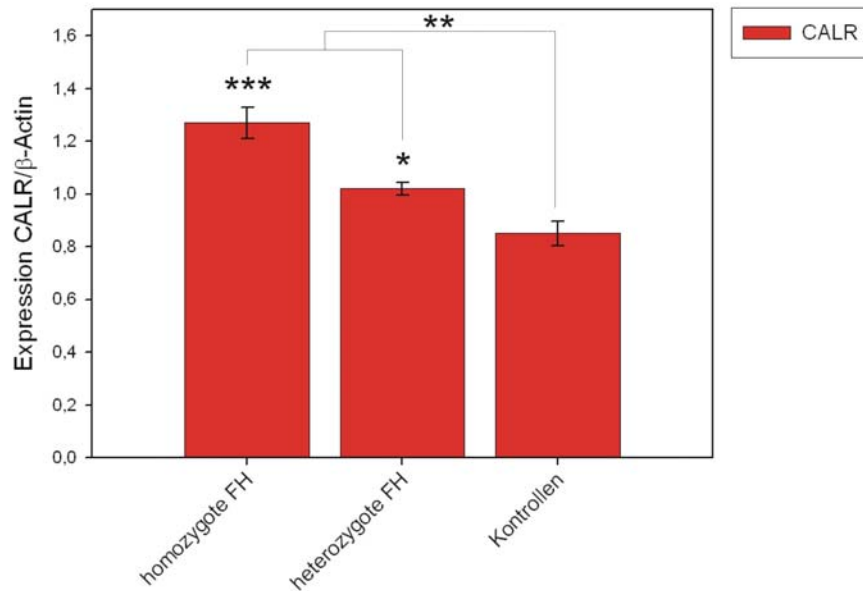


Abbildung 4-28 Die Western Blot Analyse von CALR zeigt eine höhere Protein-expression in FH-Monozyten. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5 Diskussion

5.1 *Die Aufreinigung einzelner Zelltypen führt zur Steigerung der Sensitivität von Mikroarrayanalysen.*

In den Vorarbeiten zu dieser Studie konnte demonstriert werden, dass Unterschiede zwischen den GEP einzelner Subpopulationen weißer Blutzellen bestehen. Angaben in der Literatur über zelltyp-spezifische Gene variierten stark. Auch in dieser Untersuchung konnten nur einige dieser „zelltyp-spezifischen“ Gene wieder gefunden werden (233, 234). Um zu überprüfen, ob die GEP weißer Blutzellen auch physiologische Prozesse reflektieren, wurde das Modell der erschöpfenden Belastung gewählt. Es ist bekannt, dass eine kontrollierte, erschöpfende Belastung zu einer Verschiebung des Anteils von Granulozyten und Leukozyten im Blutstrom führt (235-237, 261-263). Darüber hinaus kommt es zu einer Aktivierung von T-Zellen, sowie zur Induktion der Apoptose infolge der erschöpfenden Belastung (236, 237). Durch Untersuchungen der GEP von WBC, PBMC und T-Zellen sollte gezeigt werden, dass innerhalb der WBC ein Anstieg der Granulozytenzahl und ein Abfallen des T-Zell-Anteils durch Mikroarray-Analysen nachvollziehbar ist. Die Verfolgung der relativen Verschiebungen der einzelnen Zell-Populationen war dabei sowohl anhand der in diesen Zelltypen besonders stark exprimierten Transkripte, als auch anhand der Expression zelltyp-spezifischer Oberflächenmarker möglich. Physiologische Prozesse, wie die Aktivierung von T-Zellen und die Induktion der Apoptose, konnten in dieser Zellpopulation jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass durch die Anwesenheit weiterer Zelltypen, diese T Zell-spezifischen Prozesse nicht nur maskiert sind, sondern teilweise eine gegenläufige Genantwort zeigen und damit zu falsch positiven Ergebnissen führen. In PBMCs und aufgereinigten T-Zellen waren diese Prozesse sehr viel deutlicher sichtbar, wobei in aufgereinigten T-Zellen erwartungsgemäß die höchste Sensitivität erzielt wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die beobachteten Unterschiede in den in WBCs, PBMCs bzw. T-Zellen besonders stark exprimierten Genen durch die Anwesenheit weiterer Zelltypen erklärbar sind. Auch die Verwendung verschiedener Protokolle zur Isolation der Zellen und der Prozessierung der RNA, sowie der Einsatz unterschiedlicher Mikroarray-Plattformen tragen vermutlich zu den Differenzen in den erhaltenen Resultaten bei. Neue, unabhängige Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der durch verschiedene Mikroarray-Plattformen erhaltenen Ergebnisse bei Verwendung von Referenz-RNAs zeigen, dass zumindest innerhalb der etablierten und kommerziell erhältlichen Plattformen, eine relativ hohe Reproduzierbarkeit der Messungen gegeben ist (264-268). Bei der Analyse zelltyp-spezifischer Vorgänge zeigt sich deutlich, dass die Aufreinigung einzelner Zelltypen eine Steigerung der Sensitivität zur Folge hat. Die Ergebnisse demonstrieren ebenfalls, dass die Anwesenheit verschiedener Zelltypen, deren Genexpression durch äußere Reize z.T. gegenläufig ist, eine Auswertung zelltyp-spezifischer Vorgänge deutlich erschwert oder sogar unmöglich macht. Als Konsequenz daraus wurden bei den Untersuchungen der Genexpression bei FH nur aufgereinigte Zelltypen verwendet, welche eine Reinheit von über 95% aufwiesen.

5.2 Monozyten und T-Zellen von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie reagieren in unterschiedlicher Weise auf den LDL-R Defekt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, anhand von GEP von aufgereinigten Monozyten und T-Zellen von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie Einsicht in zelluläre Prozesse zu erhalten, die an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sind. Erste, globale Auswertungen der GEP beider untersuchter Zelltypen haben gezeigt, dass die Monozyten und T-Zellen von FH-Patienten sich von denen gesunder Individuen deutlich unterscheiden. Dabei konnte bereits durch eine Principal Component Analysis (PCA) aller in Monozyten exprimierten Gene eine Unterscheidung zwischen Kontroll-Personen und Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie vorgenommen werden. Homozygotie und Heterozygotie zeigten das gleiche Verhalten. In T-Zellen waren die Unterschiede in der Genexpression weit weniger deutlich ausgeprägt und somit nicht ausreichend, um eine Unterscheidung vor dem Hintergrund aller exprimierten Gene durch unbeeinflusste statistische Analysen zu ermöglichen.

Eine detaillierte Analyse der in Monozyten und T-Zellen differentiell exprimierten Gene zwischen Kontrollen und FH-Patienten bestätigt die Ergebnisse der PCA. In Monozyten werden weitaus mehr Gene zwischen FH-Patienten und Kontrollen differentiell exprimiert, als dies in T-Zellen der Fall ist. Eine statistische Analyse der in FH-Monozyten verstärkt exprimierten Gene unter Zuhilfenahme ihrer „Gene Ontology“ Klassifizierung, zeigte eine Überrepräsentation von Genen, welche in die Signalwege der Endozytose, dem Clathrin-Vesikel-Transport und die lysosomale Degradation eingebunden sind. Darüber hinaus erfolgte eine verstärkte Expression verschiedener Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren in FH-Monozyten. Aufgrund dieser Resultate kann vermutet werden, dass in FH-Monozyten alternative Aufnahmemechanismen für LDL gegenüber dem defekten LDL-R existieren und diese Mechanismen möglicherweise durch die ebenfalls vermehrt exprimiert gefundenen Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

Im Gegensatz zu den Monozyten, in denen die Verteilung zwischen herauf- und herunterregulierten Genen in etwa gleich ist, ist die Mehrzahl der in T-Zellen von FH-Patienten differentiell exprimierten Gene heraufreguliert. Eine funktionelle Annotationsanalyse zeigt, dass es sich bei diesen Genen vor allem um Gene der ribosomalen Proteinbiosynthese handelt. Dies ist in sofern von Bedeutung, da T-Zellen im nicht-aktivierten Zustand über eine verhältnismässig geringe Menge an Zytoplasma und zytoplasmatischen Proteinen verfügen. Kommt es allerdings zur Aktivierung, führt dies zu einem Anschwellen des Zytoplasmas und einer verstärkten Proteinbiosynthese. Dass eine T-Zellaktivierung zur Steigerung der ribosomalen Proteinbiosynthese führt und somit als ein Kriterium für den Aktivierungszustand von T-Zellen genutzt werden kann, konnte kürzlich in der Arbeit von *Chtanova et al.* nachgewiesen werden (269). Aufgrund der Funktionellen Annotations Analyse kann somit eine verstärkte T-Zellaktivierung bei FH-Patienten vermutet werden. Dies wurde, zumindest bei homozygoten FH-Patienten, durch den Nachweis einer erhöhten Expression des T-Zellaktivierungsmarkers CD69, welcher als einer der ersten Gene nach erfolgter T-Zellaktivierung exprimiert wird, bestätigt. Bei der Analyse der herabregulierten Gene zeigt sich zudem, dass einer der drei signifikantesten Cluster dieser Gengruppe durch exakt die gleichen Gene der lysosomalen Degradation gebildet wird, welche in FH-Monozyten den signifikantesten Cluster der heraufregulierten Gene bilden und untermauert damit

den Eindruck einer unterschiedlichen transkriptionellen Antwort beider Zelltypen auf den Defekt des LDL-Rezeptors.

5.3 *Monozyten und T-Zellen von FH-Patienten haben unterschiedliche Strategien für die Bereitstellung intrazellulären Cholesterins.*

Aufgrund der hervorgehobenen Funktion des LDL-R bei der Versorgung der peripheren Zellen mit Fettsäuren und Cholesterin, galt der Untersuchung von Genen des Cholesterin-Metabolismus eine besondere Aufmerksamkeit. Überraschenderweise zeigten die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen der GEP von Monozyten, dass INGIG2, SREBF2 und SCAP, die Gene des SREBP-Signalsweges sind, und die Transkription des LDL-R regulieren, in FH-Monozyten herabreguliert sind (25, 29, 270). Die transkriptionelle Regulation dieser Gene erfolgt über die intrazelluläre Verfügbarkeit von Cholesterin und dessen Derivaten wie 25-Hydroxy-Cholesterin und 27-Hydroxy-Cholesterin, welche in der Plasma-Membran lokalisiert sind und dort als Indikator des intrazellulären Cholesterinspiegels dienen (271, 272). Eine Herabregulation dieses Signalwegs erfolgt im Allgemeinen nur bei einer erhöhten Präsenz dieser Oxysterole, infolge eines Überangebots an intrazellulärem Cholesterin.

Zusätzlich wurde auch eine erniedrigte Expression von NPC1, einem Cholesterin-Transportprotein, in FH-Monozyten festgestellt. Anhand NPC1-defizienter Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass ein Defekt der NPC1-Funktion zu einer Akkumulation von intrazellulärem Cholesterin führt. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass das akkumulierte Cholesterin von einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme von LDL und nicht von einer verstärkten Cholesterin-Biosynthese stammt (273). Im Cholesterin-Metabolismus spielt NPC1 eine wichtige Rolle, da es den Cholesterin-Transport aus dem Lysosom zur Plasmamembran vermittelt, wo das Cholesterin durch ABCA1 aus der Zelle ausgeschleust werden kann. Diese Transportprozesse unterliegen hierbei der transkriptionellen Regulation durch den Liver-X-Rezeptor (LXR). Es konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass eine Verringerung der NPC1-Expression mit einem verminderten Efflux an Cholesterin über ABCA1 verbunden ist (274). Ferner ist NPC1 an der Regulation des SREBP Signalwegs beteiligt, indem es die Bildung der bereits erwähnten Oxysterole aus LDL-Cholesterin vermittelt und somit den SREBP Signalweg herabreguliert (275). Die Herabregulation von NPC1 trägt vermutlich zur Akkumulation des intrazellulären Cholesterins bei, indem es einen effizienten Cholesterin-Transport zur Plasmamembran und den damit verbundenen Efflux über ABCA1 vermindert. Auf die Regulation des SREBP-Signalwegs hat NPC1 vermutlich keinen Einfluss, da er unabhängig von der NPC1-Expression ebenso herabreguliert ist. Ein weiteres Gen, welches in den Monozyten von FH-Patienten herabreguliert gefunden wurde, ist INSIG2. Das Protein, welches durch INSIG2 kodiert wird, ist an der Steuerung der LDL-R Expression beteiligt, indem es die Translokation des SREBP/SCAP-Komplexes in Anwesenheit von Cholesterin verhindert (29). Da derzeit kaum Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation von INSIG2 vorliegen, ist der Grund für dessen beobachtete Herabregulation nicht geklärt. Es lässt sich jedoch feststellen, dass der gesamte SREBP-Signalweg inklusive seines Zielproteins, dem LDL-R in FH-Monozyten, im Gegensatz zu T-Zellen, sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygotem FH-Patienten herabreguliert ist. Aufgrund der Herabregulation der cholesterin-sensitiven Gene SREBF2, SCAP und HMGCR, ist

zu vermuten, dass FH-Monozyten über alternative LDL-Aufnahmewege verfügen, welche zu einem erhöhten intrazellulären Cholesterinspiegel im Vergleich zu Kontroll-Monozyten führen und offenbar nicht über den SREBP-Signalweg gesteuert werden. Die Ergebnisse der Funktionalen GO Analyse der in FH-Monozyten heraufregulierten Gene, zeigt eine Überrepräsentation von Genen des „coated pit“ Vesikeltransports und deutet auf eine Beteiligung alternativer Rezeptoren hin.

5.4 *Trotz LDL-R Defekts sind FH Monozyten in der Lage, nLDL zu binden und zu internalisieren.*

Bei der Analyse der GEP der Monozyten in Hinblick auf mögliche Rezeptoren, welche die vermutete erhöhte Cholesterin-Aufnahme in FH-Monozyten vermitteln, wurde die erhöhte Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, LRP1, CD68 und Stabilin-1 festgestellt. LDL-Bindungs- und Aufnahmestudien an kryokonservierten Monozyten homozygoter FH-Patienten zeigten darüber hinaus, dass FH-Monozyten in der Lage sind, natives LDL in gleichem Umfang zu binden und aufzunehmen, wie dies gesunde Kontrollzellen tun. Dies bestätigt das Vorhandensein alternativer LDL-Aufnahmesysteme bei FH-Monozyten, da alle hier verwendeten FH-Monozyten von Patienten stammen, welche nachweislich nicht in der Lage sind, über den LDL-R nLDL zu binden. Eine Analyse der Unterschiede der dosis- und zeitabhängigen Aufnahmekinetiken zwischen FH- und Kontroll-Monozyten zeigt, dass dieser Aufnahmemechanismus vor allem bei hohen Konzentrationen von nLDL aktiv ist. Eine Aufnahme von nLDL über LRP1 ist zwar denkbar, jedoch wenig wahrscheinlich, da dieser Rezeptor nur ApoE und kein ApoB binden kann (12, 66, 276, 277). Zwar sind ApoE-haltige LDL-Partikel beschrieben worden, jedoch ist ihr Anteil an der Gesamtmenge der LDL gering, wodurch eine LRP1-abhängige Aufnahme dieser Partikel *in vivo* eher eine untergeordnete Rolle bei der Formierung von Schaumzellen spielen dürfte. Für LRP1 wurde jedoch noch ein weiterer Mechanismus der LDL-Aufnahme beschrieben. Experimente mit SMC demonstrierten, dass LRP1 in der Lage ist, die Aufnahme von aggregiertem LDL (agLDL) zu vermitteln (70, 278). Obwohl dieser Mechanismus bei der Aufnahme von nLDL in den Zellkulturexperimenten, aufgrund der Abwesenheit aggregierter LDL-Partikel, ausgeschlossen werden kann, ist es dennoch möglich, dass er *in vivo* von Bedeutung ist. Einer Hypothese zufolge, wird agLDL *in vivo* in erster Linie durch das Verfangen von LDL in der Proteoglycanschicht der Endothelialwand gebildet und sollte somit proportional zum Serum-LDL-Wert ansteigen. Sollte sich diese Hypothese bewahrheiten, ist davon auszugehen, dass FH-Patienten mehr agLDL als gesunde Menschen aufweisen und eine erhöhte Expression von LRP1 in FH-Monozyten proatherogen wirken kann. Für eine Funktion von LRP1 bei der Aufnahme solcher modifizierter LDL-Partikel spricht zudem, dass hohe LDL-Konzentrationen die Expression von LRP1 induzieren, während sie die Expression des LDL-R inhibieren. Hierbei erfolgt eine gleichzeitige Regulation beider Rezeptoren über SREBF2, indem dieses die LDLR-Transkription positiv und die von LRP1 negativ reguliert (65). Eine weitere Möglichkeit der Aufnahme von nLDL stellt die Makropinozytose dar. Aufgrund der Vielzahl von in FH-Monozyten heraufregulierten Gen, welche in die Regulation des Zytoskeletts und des Vesikeltransports eingebunden sind, ist es durchaus denkbar, dass dieser Prozess auch bei FH eine Rolle spielen könnte. Neue Arbeiten auf diesem Gebiet zeigen, dass über Makropinozytose die Aufnahme von modifizierten LDL, aber auch von nLDL vermittelt werden kann, wodurch eine Schaumzellbildung induziert wird (112, 279). Ob dieser Prozess bei der Pathogenese der FH jedoch tatsächlich von Bedeutung ist, bleibt gegenwärtig offen.

5.5 **CD36 ist der Hauptrezeptor für die Aufnahme von oxLDL durch Monozyten.**

Weiterhin wurde in den Bindungs- und Aufnahmestudien eine deutlich stärkere Bindung und Aufnahme von mild oxidierten LDL (moxLDL) durch FH-Monozyten infolge der verstärkten Expression von CD36 nachgewiesen. Blockierungsexperimente mit einem spezifischen anti-CD36 Antikörper zeigten, dass CD36 etwa 50% der moxLDL Aufnahme in FH-Monozyten vermittelt. Eine Funktion von CD36 bei der Aufnahme von nLDL konnte durch die spezifische Rezeptorblockade ausgeschlossen werden. Dies widerlegt Spekulationen, denen zufolge CD36 auch als Rezeptor für nLDL dienen könnte. Diese Hypothese beruht auf Beobachtungen, wonach nLDL nach längerer Inkubation (bis zu 24 Stunden) von ausdifferenzierten Makrophagen in der Zellkultur aufgenommen wird (280, 281). In diesen Studien wurden jedoch LDL verwendet, welche aufgrund der Art ihrer Fluoreszenzmarkierung bereits als mild oxidiert angesehen werden kann. Darüber hinaus führt die Inkubation von Makrophagen mit nativen LDL in der Zellkultur über einen längeren Zeitraum zu einer enzymatischen Modifikation des LDLs, welches daraufhin verstärkt über Scavenger Rezeptoren aufgenommen wird (155). Es ist jedoch allgemein akzeptiert, dass oxLDL in der Zellkultur die Expression von CD36 sowohl in THP1 Zellen als auch in differenzierten Makrophagen induziert (159, 282, 283). Untersuchungen in Mäusen demonstrieren, dass CD36 für die Bildung von Schaumzellen verantwortlich ist und dass CD36 defiziente apoE^{-/-} Mäuse eine signifikante Reduktion atherosklerotischer Plaques im Vergleich zu CD36^{+/+} apoE^{-/-} Mäusen aufweisen (172-175, 284).

Ein Vergleich der Gesamtaufnahme von moxLDL bei gleichzeitiger Blockade der CD36-Rezeptorfunktion zeigt deutlich, dass FH-Monozyten auch nach Blockade von CD36 mehr moxLDL aufnehmen als Monozyten gesunder Individuen. Diese zusätzliche moxLDL Aufnahme wird möglicherweise durch CD68 vermittelt, da dieser innerhalb der in FH-Monozyten erhöht exprimierten Rezeptoren, neben CD36, der einzige Rezeptor ist, für den bisher eine oxLDL-Aufnahme nachgewiesen werden konnte (252, 285). Da geeignete Methoden zur Blockade der CD68-Funktion, wie beispielsweise monoklonale Antikörper, momentan nicht zur Verfügung stehen, konnte die Rolle von CD68 bei der moxLDL-Aufnahme nicht überprüft werden. Aufgrund der sehr niedrigen Expression von CD68 auf der Zelloberfläche ist jedoch davon auszugehen, dass ein möglicher Beitrag von CD68 bei der oxLDL Aufnahme durch FH-Monozyten eher gering ausfällt.

Ähnliches gilt für die Rolle von Stabilin 1 bei der moxLDL-Aufnahme. Für dieses erst kürzlich entdeckte Protein wurde bisher lediglich eine Funktion bei der Aufnahme von acetyliertem LDL (acLDL) nachgewiesen (178). Da diese Form der LDL-Modifikation *in vivo* nicht vorzukommen scheint, bleibt die Funktion von Stabilin-1 bei der LDL-Aufnahme unklar. Zurzeit befinden sich Antikörper zur Inhibierung der Stabilin-1 Rezeptorfunktion in der Entwicklung. Sobald diese zur Verfügung stehen, können weitere Untersuchungen Aufschluss über die Funktion von Stabilin-1 bei der LDL-Aufnahme und darüber hinaus geben.

5.6 **Die gesteigerte Aufnahme von oxLDL wirkt zytotoxisch in FH-Monozyten.**

Einer der wahrscheinlich wichtigsten Effekte der gesteigerten oxLDL-Aufnahme durch FH-Monozyten ist die damit assoziierte gesteigerte Anzahl apoptotischer und toter Zellen. Aufgrund der dreifach erhöhten Serum-oxLDL-Werte, welche in homozygoten FH-Patienten festgestellt wurden, hat die beobachtete gesteigerte Apoptose-Rate von FH-Monozyten durch oxLDL Aufnahme in der Zellkultur bei dieser Patientengruppe eine besondere Relevanz. Da es sich bei den hier verwendeten Zellen um Monozyten handelt, denen in der Zellkultur nicht die Möglichkeit zur Umdifferenzierung in Makrophagen gegeben wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass ähnliche Prozesse auch *in vivo* in der Zirkulation stattfinden. Obwohl heterozygote Patienten ähnliche Serum-oxLDL-Werte wie gesunde Kontrollen aufweisen, konnte bei ihnen ebenfalls eine erhöhte Expression von CD36 festgestellt werden. Es kann daher vermutet werden, dass bei heterozygoten FH-Monozyten ähnliche oxLDL-Aufnahme-Mechanismen aktiv sind, diese jedoch aufgrund der niedrigeren Serum-oxLDL-Werte langsamer verlaufen. Diese Vermutungen stehen im Einklang mit der allgemein akzeptierten Zytotoxizität von oxLDL auf Makrophagen und Zellen des Endothels (153, 230, 286).

Zusätzlich zu der erhöhten Aufnahme von oxLDL weisen homozygote FH-Monozyten eine deutlich reduzierte Expression von ABCA1 auf. Bei diesem Transportprotein handelt es sich um eines der wichtigsten Effluxsysteme für Cholesterin in Monozyten und Makrophagen (287-289). Dieser anfangs überraschende Befund lässt sich jedoch anhand der beobachteten Physiologie der FH-Monozyten erklären. Hierbei tragen drei additiv wirkende Faktoren zur Degradation von ABCA1, sowohl auf transkriptioneller, als auch auf Proteinebene bei: 1) Untersuchungen an „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVEC) zeigen, dass oxLDL zu einer Degradation der ABCA1 mRNA führt. Auch auf Proteinebene induziert oxLDL die Degradation von ABCA1 (290). Untersuchungen an J774-Makrophagen demonstrieren zusätzlich einen reduzierten Efflux von Cholesterin aus oxLDL über ABCA1 (291). 2) Eine verminderte Expression von NPC1 führt ebenfalls zu einer Herabregulation von ABCA1 (274), zusätzlich wurde festgestellt, dass Patienten mit Niemann-Pick Typ C Disease, welche einen Defekt im NPC1-Gen haben, ebenfalls eine reduzierte Expression von ABCA1 aufweisen. Hierbei korreliert die NPC1-Gendosis mit der Expression von ABCA1, d.h. die Höhe der Expression von ABCA1 liegt bei heterozygoten NPC1-Patienten zwischen der von gesunden Kontrollen und der von homozygoten NPC1-Patienten (292). 3) Es konnte gezeigt werden, dass SREBF2 ein positiver Regulator der ABCA1-Expression ist (293), eine erniedrigte Expression von SREBF2 in FH-Monozyten kann somit zusätzlich zu einer reduzierten ABCA1-Expression beitragen. Aufgrund des erhöhten Influx von oxLDL und des gleichzeitig gestörten Efflux über ABCA1 ist es nachvollziehbar, warum FH-Monozyten einen höheren intrazellulären Cholesterinspiegel aufweisen als gesunde Kontrollen.

5.7 Die Abwesenheit von Scavenger Rezeptoren auf T-Zellen kann die Unterschiede in den Regulationsmechanismen beider Zelltypen bei FH-Patienten erklären.

Bisher konnte keine Expression von Scavenger Rezeptoren in T-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Unterschied gegenüber den Monozyten könnte somit die unterschiedlichen Strategien erklären, welche beide Zelltypen wählen, um auf einen LDL-R Defekt zu reagieren. Aufgrund des Fehlens von Scavenger Rezeptoren können T-Zellen einem intrazellulären Cholesterinmangel nur durch Heraufregulation ihrer *de novo* Cholesterin-Biosynthese begegnen. Dies ist bei homozygoten FH-Patienten anhand der Heraufregulation von HMGCR und ACAT2, welches beides Schlüsselenzyme der Cholesterin-Biosynthese darstellen, zu erkennen (248). Für dieses Model spricht zudem, dass es ebenfalls den Unterschied zwischen homozygoten und heterozygoten FH-T-Zellen hinsichtlich der Cholesterin-Biosynthese erklären kann. Da sich T-Zellen, solange sie nicht aktiviert sind, im Ruhezustand befinden, ist ihr Cholesterinbedarf vergleichsweise gering. Kommt es jedoch zur Aktivierung, ist dies auch mit einer Vergrößerung der Plasmamembran verbunden und der Bedarf an Cholesterin steigt.

Bei T-Zellen homozygoter FH-Patienten konnte eine erhöhte CD69-Expression gegenüber heterozygoten FH-Patienten nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass T-Zellen homozygoter FH-Patienten einen höheren Aktivierungsstatus als heterozygote FH-T-Zellen aufweisen. Der Grund für die alleinige Aktivierung homozygoter T-Zellen ist vermutlich in den erhöhten Serum-oxLDL-Werten dieser Patienten zu suchen. Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass in Gegenwart von oxLDL, Antikörper gegen diese LDL-Modifikation gebildet werden und somit zu einer Aktivierung des Immunsystems führen. Obwohl ihre genaue Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose noch nicht vollständig klar ist, sprechen verschiedene Studien für eine antiatherogene Rolle dieser Antikörper, indem diese die Aufnahme von oxLDL durch Phagozyten unterstützen und weiterhin apoptotische Zellen, welche oxLDL enthalten, markieren und somit deren Entsorgung durch das Immunsystem ermöglichen (294-297).

Der Unterschied bei der Regulation der Cholesterin-Biosynthese in T-Zellen homozygoter und heterozygoter FH-Patienten lässt sich vermutlich durch zwei Faktoren erklären. Zum einen, ist aufgrund eines niedrigeren Aktivierungszustands heterozygoter T-Zellen der Bedarf an Cholesterin in diesen Zellen geringer. Zweitens, reicht offenbar das verbliebene intakte Allel des LDL-R aus, um eine ausreichende Menge von funktionell aktiven LDL-R bereitzustellen um den geringeren Cholesterinbedarf, aufgrund eines niedrigeren Aktivierungsstatus, zu decken.

5.8 Mögliche Konsequenzen einer Statintherapie auf das Immunsystem homozygoter FH-Patienten

Anhand der Expression der HMGCR kann in diesem Zusammenhang auch der Einfluss einer Statin-Therapie gezeigt werden. In Monozyten ist auch ohne Statin-Therapie die Expression der HMGCR sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten FH-Patienten gesenkt. Dies geschieht vermutlich aufgrund der erhöhten Expression von Scavenger Rezeptoren bei diesen Patienten und der damit

verbundenen erhöhten Aufnahme von LDL. Eine Gabe von Statinen senkt die *de novo* Cholesterinbiosynthese in diesen Zellen noch zusätzlich. T-Zellen homozygoter FH-Patienten weisen ohne Statin-Therapie eine deutliche Erhöhung der HMGCR-Expression auf, wobei heterozygote FH-Patienten ein HMGCR-Expressionsniveau aufweisen, welches mit dem der Kontrollen vergleichbar ist. Dies spiegelt den bereits erwähnten unterschiedlichen Bedarf zelluläre Synthese von Cholesterin zwischen homozygoten und heterozygoten FH-Patienten in T-Zellen wider. Wie in Monozyten führt auch in T-Zellen die Gabe von Statinen zu einer Senkung der HMGCR-Expression. Die Beobachtung, dass T-Zellen homozygoter FH-Patienten sowohl die Cholesterinbiosynthese, als auch die LDL-R-Transkription heraufregulieren, deutet darauf hin, dass diese Zellen ihren Bedarf an Cholesterin über eine Neusynthese decken, da die LDL-R Expression allein, trotz der verbliebenen Restaktivität einiger homozygoter LDL-R Mutationen, nicht ausreichend sein dürfte. Bezüglich homozygoter FH-T-Zellen, stellt sich die Frage, inwieweit die Gabe von Statinen bei diesen Patienten sinnvoll ist, da der komplette Entzug aller Cholesterinquellen möglicherweise negative Konsequenzen auf das Immunsystem haben könnte.

Da Statine ihre LDL-senkende Wirkung in erster Linie über die Heraufregulation des hepatischen LDL-R vermitteln (298, 299), ist es fraglich, ob diese Therapie bei schweren homozygoten Mutationen sinnvoll ist. Bei der Betrachtung der Verhältnisse in den Monozyten homozygoter FH-Patienten scheint eine Statin-Therapie nicht notwendig, da die Aufnahme von nLDL in gleichen Umfang wie bei gesunden Kontrollen stattfindet und der Großteil der oxLDL-Aufnahme über CD36 erfolgt. Eine Statin-Behandlung scheint auf keinen der beiden Vorgänge einen Einfluss zu haben. Darüber hinaus ist der Cholesterin-Biosyntheseweg in diesen Zellen ohnehin herabreguliert.

5.9 Die Monozyten von FH-Patienten exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle

Ein weiterer Befund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen an Monozyten ist die erhöhte Expression von ITGB1 auf der Zelloberfläche von homozygoten und heterozygoten FH-Patienten. Da hierdurch die Wahrscheinlichkeit der Interaktion und Bindung der Monozyten an Endothelzellen erhöht wird, kann dies als ein proatherogener Faktor interpretiert werden. Einer dieser Interaktionsmechanismen erfolgt durch Bindung des ITGB1/ITGA4 Komplexes auf Monozyten an CS-1, welches auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Diese Bindung wird durch oxLDL induziert und ist unabhängig von E-Selektin- oder P-Selektin-abhängigen Adhäsionsprozessen. Es konnte gezeigt werden, dass lediglich die Bildung von ITGB1 durch oxLDL in Monozyten induziert wird, welches anschließend mit ITGA4, das bereits auf der Zelloberfläche vorhanden ist, dimerisiert. Auf diese Weise können Monozyten durch das Endothel transmigrieren und zur Plaquebildung beitragen (123).

Studien in Monozyten konnten belegen, dass LRP1 an der Regulation der Oberflächenpräsentation von ITGB1 beteiligt ist. Dies geschieht, indem LRP1 die posttranslationale Prozessierung von ITGB1 und dessen anschließenden Transport zur Zelloberfläche reguliert (84). Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang hat CALR, welches als Bindeglied zwischen LRP1 und ITGB1 agieren kann und damit die posttranslationale Modifikation von ITGB1 durch LRP1 ermöglicht (84).

5.10 Die FH-Patienten weisen einen geringeren Anteil an CD14⁺CD16⁺-Monozyten auf.

Eine Analyse der Subpopulationen der Monozyten zeigte einen reduzierten Anteil von CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei FH-Patienten. Diese speziellen Monozyten, welche oft als residente Monozyten bezeichnet werden, wandern kurz nach ihrem Erscheinen im Blut in das periphere Gewebe aus, wo sie sich in Dendritische Zellen umdifferenzieren können (249-251). Die Analyse der Oberflächenexpression dieser CD16⁺ Monozyten zeigte, dass FH-Patienten neben einer erhöhten Expression von ITGB1 auf diesen Zellen, auch eine erhöhte Expression von CD11c aufweisen. Ein Kennzeichen myelitischer Dendritischer Zellen, welche aus Monozyten hervorgehen, ist neben einer erhöhten Expression von CD68, welche ebenfalls in diesen Zellen nachgewiesen wurde, eine Erhöhung der CD11c-Expression (176, 258). Zellkulturstudien mit oxidierten Lipoproteinen konnten zeigen, dass oxLDL eine Umdifferenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen induzieren können und zu deren Aktivierung führen. Durch diese Aktivierung wird ihre Kapazität zur T-Zellaktivierung deutlich gesteigert (300-302). Zudem konnte in Zellkultur-Experimenten nachgewiesen werden, dass oxLDL die Adhäsion und Transmigration von Dendritischen Zellen an und durch Endothelzellschichten induziert (303). Da der prozentuelle Anteil an CD16⁺-Monozyten, welche als Vorläuferzellen von Dendritischen Zellen angesehen werden können, im Blut von FH-Patienten reduziert ist und diese zusätzlich Differenzierungsmerkmale von Dendritischen Zellen, sowie eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit aufweisen, ist zu vermuten, dass bei FH-Patienten eine erhöhte Bildung von Dendritischen Zellen aus CD16⁺ Monozyten stattfindet. Diese verlassen nach ihrer Umdifferenzierung die Blutbahn. Untersuchungen an atherosklerotischen Plaques konnten zeigen, dass Dendritische Zellen bereits in frühen Stadien der Atherosklerose in der Intima zu finden sind und in späteren Stadien der Plaqueeentwicklung maßgeblich zur Instabilität dieser Plaques beitragen (304, 305). Eine Destabilisierung findet hier vor allem aufgrund der Lokalisation der Dendritischen Zellen an den Schultern des Plaques statt, wo sie Cluster mit T-Zellen bilden (306-308). Es kann somit vermutet werden, dass ähnliche Prozesse auch bei der Atheroskleroseentstehung in FH-Patienten stattfinden. Zusätzlich kann eine erhöhte Differenzierung von Dendritischen Zellen aus CD16⁺-Monozyten, infolge gesteigerter oxLDL-Serum-Werte bei homozygoten FH-Patienten, auch die beobachtete T-Zellaktivierung bei diesen Patienten erklären, indem die Dendritischen Zellen oxLDL prozessieren und den T-Zellen präsentieren. Dieser Vorgang konnte in der Zellkultur mehrfach beobachtet werden (177, 309, 310).

5.11 Vorgeschlagenes Modell zur Atheroskleroseentstehung bei FH-Patienten

Zusammengefasst konnten die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Monozyten und T-Zellen von FH-Patienten erstmalig Vorgänge im Menschen beschreiben, welche vorher nur aus dem Tiermodell oder der Zellkultur bekannt waren. Es wurden Hinweise gefunden, dass Monozyten von FH-Patienten über einen LDL-R-unabhängigen Weg für die Aufnahme von nLDL verfügen, welcher in T-Zellen oder Fibroblasten dieser

Patienten nicht existiert. Eine Möglichkeit hierbei stellt die Makropinozytose dar, welche durch Vermittlung der Aufnahme von nLDL zur Schaumzellbildung führen kann (112). Die Ergebnisse der hier gezeigten Aufnahmestudien demonstrieren eine erhöhte Aufnahme von nLDL durch FH-Monozyten, besonders bei hohen nLDL-Konzentrationen. Da FH-Patienten höhere Serum-LDL-Werte aufweisen, könnte dieser alternative Aufnahmeweg zur Entstehung der Atherosklerose beitragen. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass oxLDL aufgrund der erhöhten Expression von CD36 von FH-Monozyten verstärkt aufgenommen wird und dadurch zur Induktion der Apoptose und zum Absterben dieser Zellen führt. Bei der Phagozytose dieser toten Zellen könnte LRP1 eine wichtige Rolle zukommen, da es zusammen mit CALR auf Monozyten als Rezeptor für apoptotischen Zellen aktiv ist und deren Phagozytose vermittelt. Ein solcher Mechanismus erfolgt über die Markierung der apoptotischen Zellen durch den Komplementfaktor C1q. Die so markierte apoptotische Zelle wird durch den LRP1/CALR Komplex auf Makrophagen erkannt und anschliessend phagozytiert (83, 260, 311, 312). Aufgrund der Erkenntnisse, dass oxLDL die Fähigkeit von Monozyten zur Phagozytose apoptotischer Zellen beeinträchtigen (313), ist es denkbar, dass eine physiologische Schwelle existiert, bei der die Menge apoptotischer Zellen infolge der oxLDL-Aufnahme die Fähigkeiten des ebenfalls durch oxLDL-geschwächten Phagozytosesystems übersteigt und zu einer ungenügenden Entfernung toter Zellen aus der Blutbahn führt (Abbildung 5-1). Hinweise darauf, dass eine eingeschränkte Phagozytose bei der Atherosklerose-Entstehung eine Rolle spielen könnte, wurden anhand von Zellkulturexperimenten und im Tiermodell bereits gefunden (314).

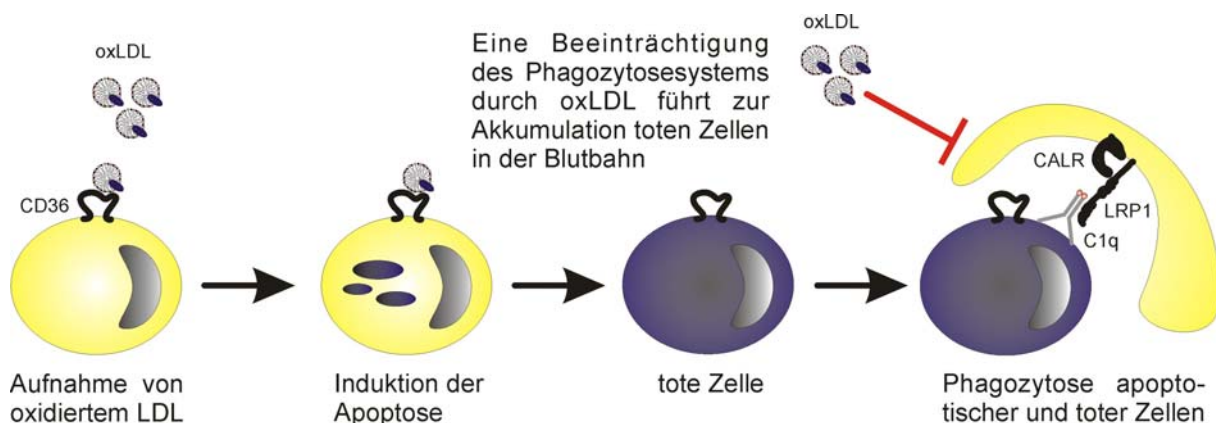


Abbildung 5-1 Entstehung toter Zellen infolge hoher Serum-oxLDL-Werte, Durch die erhöhte Expression von CD36 auf FH-Monozyten nehmen diese verstärkt oxLDL auf. Dies resultiert in einer erhöhten Anzahl apoptotischer und toter Zellen, welche aufgrund der Beeinträchtigung des Phagozytosesystems nicht ausreichend aussortiert werden und im Blutstrom akkumulieren.

Es ist denkbar, dass diese toten Zellen aufgrund der Beeinträchtigung des laminaren Flusses des Bluts in den Atherienbögen, welche die Hauptzentren der Atherombildung darstellen, akkumulieren (1, 2). Dort können sie dann punktuell durch Freisetzen des Zytoplasmas und des enthaltenen oxLDLs lokale Entzündungsreaktionen in Gang setzen. Diese wiederum führen zur Ausschüttung von Chemokinen durch Endothelzellen und zur anschließenden Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen an diese Gefäßwand-Abschnitte (Abbildung 5-2). Durch die lokale Ansammlung toter, oxLDL überladener Monozyten kommt es zu Anreicherungen mit oxLDL an den diesen exponierten Stellen der Plaquebildung und erklärt somit den hohen Anteilen an oxLDL, welcher in diesen Atheromen gefunden wird. Aufgrund dieser lokalen Entzündungsherde kommt es nun zur Aktivierung der

Dendritischen Zellen. Diese nehmen zusammen mit den rekrutierten Makrophagen Zelltrümmer und oxLDL auf und präsentieren es den ebenfalls rekrutierten T-Zellen. Aufgrund dieser Präsentation und der Gegenwart von oxLDL kommt es dann zu einer T-Zellaktivierung und Proliferation (129, 315). Dieser Mechanismus könnte somit auch eine Erklärung für die T-Zellaktivierung bei homozygoten FH-Patienten geben (Abbildung 5-2 und Abbildung 5-3).

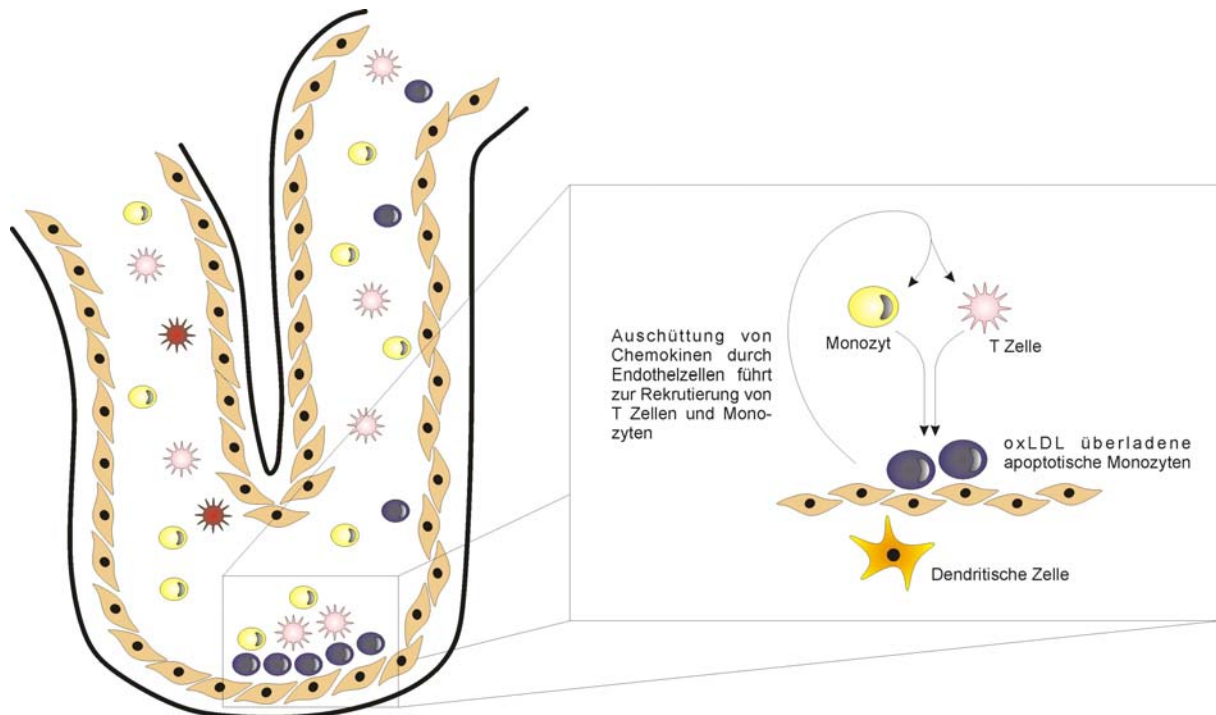


Abbildung 5-2 Akkumulation nicht phagozytierter apoptotischer Zellen an besonders exponierten Stellen der Arterien, Die lokale Akkumulation toter Zellen hat auch eine lokale Anreicherung von aufgenommenem oxLDL zur Folge an diesen Stellen zur Folge. Dies führt zur Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen durch Chemokine, welche von Endothelzellen ausgeschüttet werden, wodurch lokale Entzündungsherde entstehen.

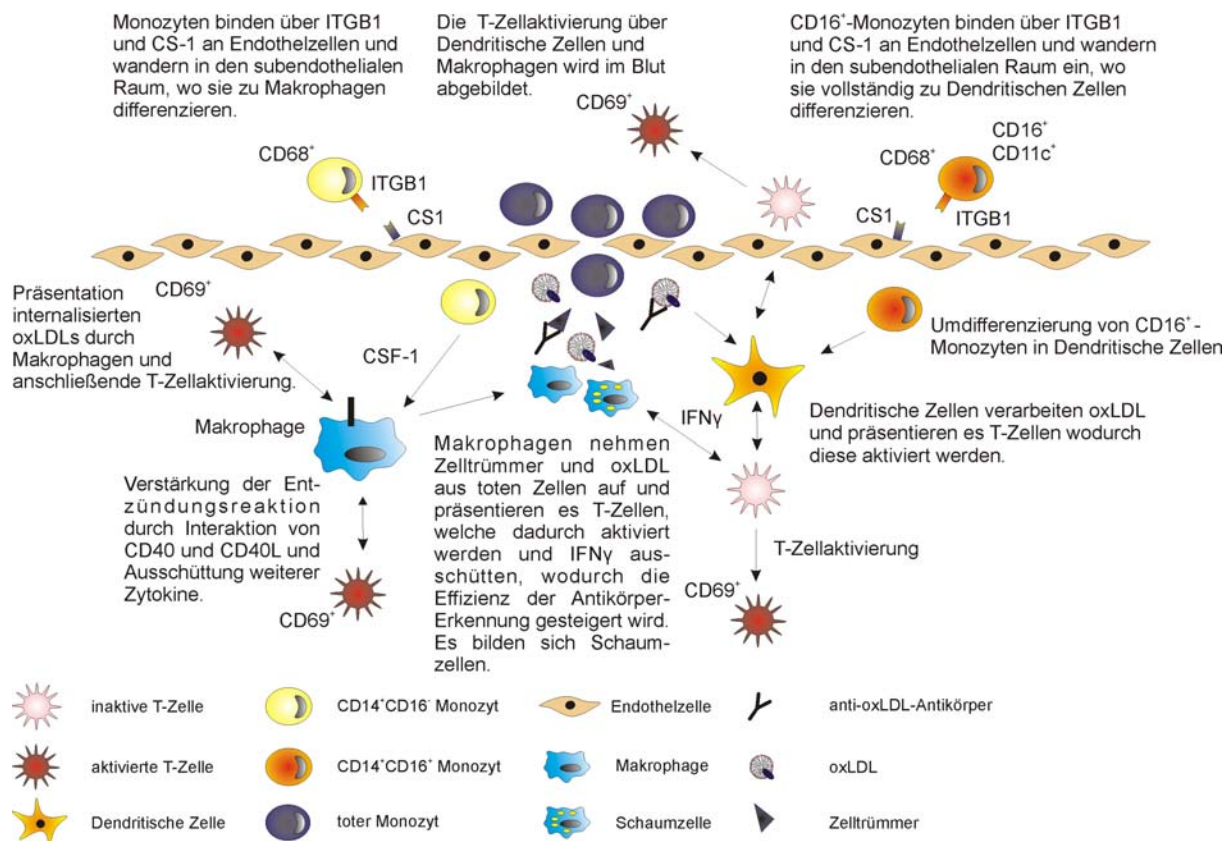


Abbildung 5-3 Subendotheliale Vorgänge bei der Plaquebildung

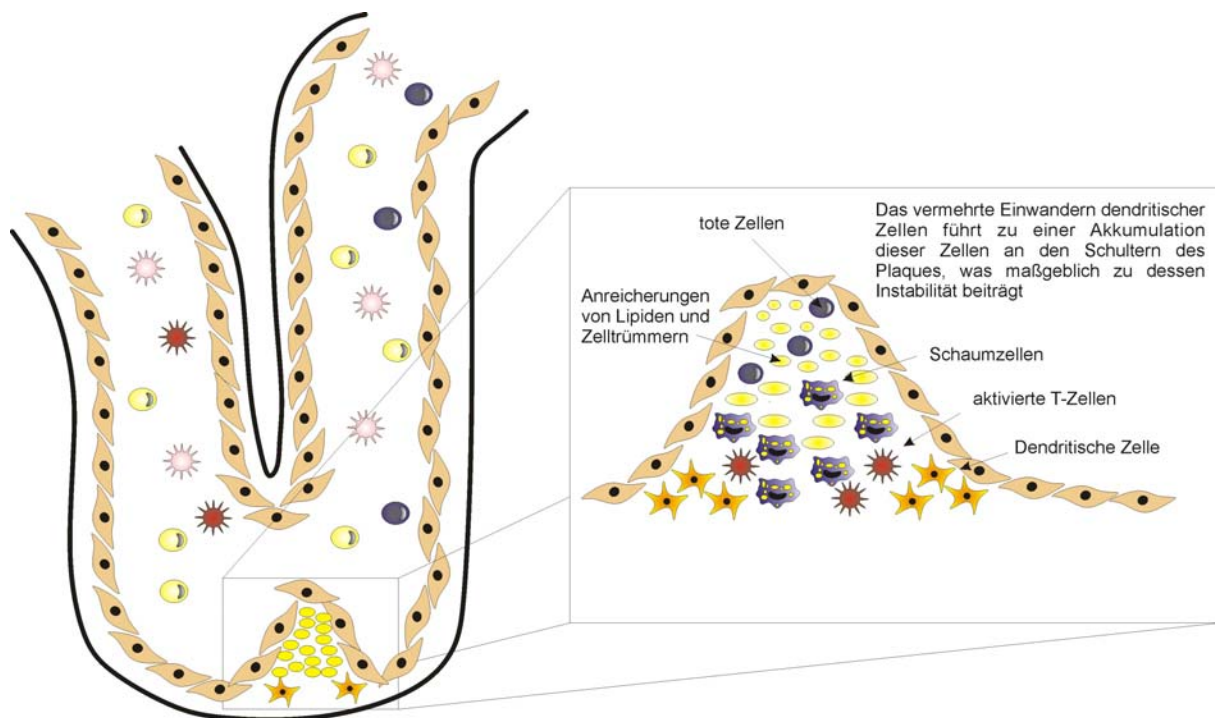


Abbildung 5-4 Erhöhte Instabilität der atherosklerotischen Plaques durch Akkumulation von dendritischen Zellen

Abschliessend kann festgestellt werden, dass bereits zirkulierende Monozyten und T-Zellen Vorgänge abbilden, von denen bisher angenommen wurde, dass sie einzig im Subendothelialraum an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind. Dies bedeutet, dass bereits im Blut Vorgänge stattfinden, welche die

Atheroskleroseentwicklung fördern. Hierbei handelt es sich vor allem um die Induktion der Apoptose, welche vermutlich durch CD36 vermittelte oxLDL Aufnahme induziert wird, und die Aktivierung von T-Zellen.

5.12 Die Bedeutung der Ergebnisse für die Therapie und Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie

Aufgrund der hier vorgestellten Beobachtungen und Daten anderer scheinen sich vor allem Monozyten als therapeutische Ziele einer Atherosklerose-Therapie anzubieten (149, 173-175, 316, 317). Aufgrund der hervorgehobenen Funktion von CD36 bei der Aufnahme von oxLDL bietet sich dieser Rezeptor als ein mögliches Ziel einer Therapie an. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten dieses Rezeptors eine deutliche Reduktion atherosklerotischer Plaques zur Folge hat (172-175). Untersuchungen an CD36 defizienten Patienten zeigen zwar eine reduzierte Aufnahme von oxLDL, jedoch wurde ebenfalls festgestellt, dass dieser Rezeptor im Myokard eine wichtige Rolle bei der Versorgung des Herzgewebes mit Fettsäuren spielt. Ein Defekt der CD36-Funktion bei diesen Patienten führt deshalb zu einer kardialen Dysfunktion (285, 318-320). Aus diesem Grund sollte nach Technologien gesucht werden, die eine zelltyp-spezifische Inhibierung der CD36-Funktion erlauben. Weiterhin muss der Aufnahmemechanismus für nLDL durch FH-Monozyten näher untersucht werden, um zu klären, ob hier therapeutische Ansätze für die Behandlung von FH-Patienten gefunden werden können. Auch die Funktion weiterer Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise NK-Zellen, die im Zusammenhang der Entwicklung atherosklerotischer Prozesse ebenfalls eine Rolle zu spielen scheinen, sollten näher untersucht werden (321, 322).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen das diagnostische und pathophysiologische Potential einer globalen Transkriptomanalyse. Derzeit sind bereits erste diagnostische Kits auf Mikroarray-Basis in der klinischen Prüfung, welche die Diagnose von Brustkrebs und Leukämie erlauben (323-325). Aufgrund der ausgeprägten Signaturen, welche in Monozyten festgestellt wurden, ist es denkbar, dass in absehbarer Zeit auch Mikroarraykits entwickelt werden können, welche das Fortschreiten einer sich entwickelnden Atherosklerose genauer diagnostizieren können und somit zu einer gezielteren und verbesserten Diagnose und Therapie der Atherosklerose beitragen können.

6 Literaturverzeichnis

1. Lusis, A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
2. Hansson, G.K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695.
3. Goldbourt, U., and Neufeld, H.N. 1986. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 6:357-377.
4. Libby, P. 2000. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247:349-358.
5. Hansson, G.K., and Libby, P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6:508-519.
6. Hansson, G.K. 2001. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1876-1890.
7. van Aalst-Cohen, E.S., Jansen, A.C., de Jongh, S., de Sauvage Nolting, P.R., and Kastelein, J.J. 2004. Clinical, diagnostic, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med* 4:31-41.
8. Austin, M.A., Hutter, C.M., Zimmern, R.L., and Humphries, S.E. 2004. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol* 160:421-429.
9. Hutter, C.M., Austin, M.A., and Humphries, S.E. 2004. Familial hypercholesterolemia, peripheral arterial disease, and stroke: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol* 160:430-435.
10. Marks, D., Thorogood, M., Neil, H.A., and Humphries, S.E. 2003. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 168:1-14.
11. Löffler, and Petrides. 2003. Biochemie und Pathobiochemie.
12. Strickland, D.K., Gonias, S.L., and Argraves, W.S. 2002. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 13:66-74.
13. Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249:5153-5162.
14. Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, J.L., and Russell, D.W. 1984. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39:27-38.
15. Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1992. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 13 Suppl B:34-36.
16. Sudhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Russell, D.W. 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228:815-822.
17. Davis, C.G., van Driel, I.R., Russell, D.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1987. The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. *J Biol Chem* 262:4075-4082.
18. Wakeham, D.E., Chen, C.Y., Greene, B., Hwang, P.K., and Brodsky, F.M. 2003. Clathrin self-assembly involves coordinated weak interactions favorable for cellular regulation. *Embo J* 22:4980-4990.

19. Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R., and McMahon, H.T. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419:361-366.
20. Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. 2001. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291:1051-1055.
21. Spady, D.K. 1992. Hepatic clearance of plasma low density lipoproteins. *Semin Liver Dis* 12:373-385.
22. Sudhof, T.C., Van der Westhuyzen, D.R., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Russell, D.W. 1987. Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 262:10773-10779.
23. Chang, R., Yang, E., Chamblis, D., Kumar, A., Wise, J., and Mehta, K.D. 1996. In vivo role of the Sp1 site neighboring sterol-responsive element-1 in controlling low-density lipoprotein receptor gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 218:733-739.
24. Smith, J.R., Osborne, T.F., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1990. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 265:2306-2310.
25. Rawson, R.B. 2003. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:631-640.
26. Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1993. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75:187-197.
27. Briggs, M.R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1993. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 268:14490-14496.
28. Wang, X., Briggs, M.R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1993. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 268:14497-14504.
29. Kong, W.J., Liu, J., and Jiang, J.D. 2006. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. *J Mol Med* 84:29-36.
30. Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109:1125-1131.
31. Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1995. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem* 270:29422-29427.
32. Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X., and Goldstein, J.L. 1994. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77:53-62.
33. Nohturfft, A., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1998. Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem* 273:17243-17250.
34. Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1996. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 87:415-426.

35. Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489-500.
36. Yabe, D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12753-12758.
37. Radhakrishnan, A., Sun, L.P., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 2004. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* 15:259-268.
38. Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 2002. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell* 10:237-245.
39. Adams, C.M., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 2003. Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10647-10652.
40. Espenshade, P.J., Li, W.P., and Yabe, D. 2002. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11694-11699.
41. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11041-11048.
42. Nohturfft, A., DeBose-Boyd, R.A., Scheek, S., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1999. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11235-11240.
43. Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Sakai, J. 1997. Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 272:12778-12785.
44. Duncan, E.A., Dave, U.P., Sakai, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1998. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem* 273:17801-17809.
45. Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. 2001. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 276:36431-36437.
46. Windler, E.E., Kovanen, P.T., Chao, Y.S., Brown, M.S., Havel, R.J., and Goldstein, J.L. 1980. The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J Biol Chem* 255:10464-10471.
47. Hodgin, J.B., and Maeda, N. 2002. Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* 143:4495-4501.
48. Bruning, J.C., Lingohr, P., Gillette, J., Hanstein, B., Avci, H., Krone, W., Muller-Wieland, D., and Kotzka, J. 2003. Estrogen receptor-alpha and Sp1 interact in the induction of the low density lipoprotein-receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:113-121.
49. Li, C., Briggs, M.R., Ahlborn, T.E., Kraemer, F.B., and Liu, J. 2001. Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology* 142:1546-1553.

50. Parini, P., Angelin, B., and Rudling, M. 1997. Importance of estrogen receptors in hepatic LDL receptor regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1800-1805.
51. Ness, G.C. 1991. Thyroid hormone. Basis for its hypocholesterolemic effect. *J Fla Med Assoc* 78:383-385.
52. Bakker, O., Hudig, F., Meijssen, S., and Wiersinga, W.M. 1998. Effects of triiodothyronine and amiodarone on the promoter of the human LDL receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 249:517-521.
53. Ness, G.C., and Lopez, D. 1995. Transcriptional regulation of rat hepatic low-density lipoprotein receptor and cholesterol 7 alpha hydroxylase by thyroid hormone. *Arch Biochem Biophys* 323:404-408.
54. Duntas, L.H. 2002. Thyroid disease and lipids. *Thyroid* 12:287-293.
55. Wade, D.P., Knight, B.L., and Soutar, A.K. 1989. Regulation of low-density-lipoprotein-receptor mRNA by insulin in human hepatoma Hep G2 cells. *Eur J Biochem* 181:727-731.
56. Duvillard, L., Florentin, E., Lizard, G., Petit, J.M., Galland, F., Monier, S., Gambert, P., and Verges, B. 2003. Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care* 26:1540-1544.
57. Streicher, R., Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Siemeister, G., Munck, M., Avci, H., and Krone, W. 1996. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* 271:7128-7133.
58. Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Roth, G., Kremer, L., Munck, M., Schurmann, S., Knebel, B., and Krone, W. 2000. Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J Lipid Res* 41:99-108.
59. Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Koponen, A., Njamen, D., Kremer, L., Roth, G., Munck, M., Knebel, B., and Krone, W. 1998. ADD1/SREBP-1c mediates insulin-induced gene expression linked to the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 249:375-379.
60. Roth, G., Kotzka, J., Kremer, L., Lehr, S., Lohaus, C., Meyer, H.E., Krone, W., and Muller-Wieland, D. 2000. MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *J Biol Chem* 275:33302-33307.
61. Kotzka, J., Lehr, S., Roth, G., Avci, H., Knebel, B., and Muller-Wieland, D. 2004. Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem* 279:22404-22411.
62. Wilson, G.M., Vasa, M.Z., and Deeley, R.G. 1998. Stabilization and cytoskeletal-association of LDL receptor mRNA are mediated by distinct domains in its 3' untranslated region. *J Lipid Res* 39:1025-1032.
63. Wilson, G.M., Roberts, E.A., and Deeley, R.G. 1997. Modulation of LDL receptor mRNA stability by phorbol esters in human liver cell culture models. *J Lipid Res* 38:437-446.
64. Knouff, C., Malloy, S., Wilder, J., Altenburg, M.K., and Maeda, N. 2001. Doubling expression of the low density lipoprotein receptor by truncation of the 3'-untranslated region sequence ameliorates type iii hyperlipoproteinemia in mice expressing the human apoe2 isoform. *J Biol Chem* 276:3856-3862.
65. Llorente-Cortes, V., Costales, P., Bernues, J., Camino-Lopez, S., and Badimon, L. 2006. Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 Negatively

- Regulates Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Transcription. *J Mol Biol*.
66. Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V., and Brown, M.S. 1989. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5810-5814.
 67. Chappell, D.A., Fry, G.L., Waknitz, M.A., Muhonen, L.E., Pladet, M.W., Iverius, P.H., and Strickland, D.K. 1993. Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem* 268:14168-14175.
 68. Krapp, A., Ahle, S., Kersting, S., Hua, Y., Kneser, K., Nielsen, M., Gliemann, J., and Beisiegel, U. 1996. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J Lipid Res* 37:926-936.
 69. Reblin, T., Niemeier, A., Meyer, N., Willnow, T.E., Kronenberg, F., Dieplinger, H., Greten, H., and Beisiegel, U. 1997. Cellular uptake of lipoprotein[a] by mouse embryonic fibroblasts via the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *J Lipid Res* 38:2103-2110.
 70. Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. 2000. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1572-1579.
 71. Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Hurt-Camejo, E., Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. 2002. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:387-393.
 72. Guyton, J.R., Klemp, K.F., and Mims, M.P. 1991. Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles. *J Lipid Res* 32:953-962.
 73. Aviram, M., Maor, I., Keidar, S., Hayek, T., Oiknine, J., Bar-El, Y., Adler, Z., Kertzman, V., and Milo, S. 1995. Lesioned low density lipoprotein in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient transgenic mice and in humans is oxidized and aggregated. *Biochem Biophys Res Commun* 216:501-513.
 74. Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. 1998. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:738-746.
 75. Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. 1999. Differential cholesteryl ester accumulation in two human vascular smooth muscle cell subpopulations exposed to aggregated LDL: effect of PDGF-stimulation and HMG-CoA reductase inhibition. *Atherosclerosis* 144:335-342.
 76. Hussaini, I.M., Srikumar, K., Quesenberry, P.J., and Gonias, S.L. 1990. Colony-stimulating factor-1 modulates alpha 2-macroglobulin receptor expression in murine bone marrow macrophages. *J Biol Chem* 265:19441-19446.
 77. Misra, U.K., Gawdi, G., Gonzalez-Gronow, M., and Pizzo, S.V. 1999. Coordinate regulation of the alpha(2)-macroglobulin signaling receptor and the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha(2)-macroglobulin receptor by insulin. *J Biol Chem* 274:25785-25791.
 78. Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Sanchez, S., Rodriguez, C., and Badimon, L. 2002. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible

- involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* 106:3104-3110.
79. Handschug, K., Schulz, S., Schnurer, C., Kohler, S., Wenzel, K., Teichmann, W., and Glaser, C. 1998. Low-density lipoprotein receptor-related protein in atherosclerosis development: up-regulation of gene expression in patients with coronary obstruction. *J Mol Med* 76:596-600.
 80. Schulz, S., Birkenmeier, G., Schagdarsurengin, U., Wenzel, K., Muller-Werdan, U., Rehfeld, D., Suss, T., Kabisch, A., Werdan, K., and Glaser, C. 2003. Role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol* 92:137-144.
 81. Schulz, S., Schagdarsurengin, U., Greiser, P., Birkenmeier, G., Muller-Werdan, U., Hagemann, M., Riemann, D., Werdan, K., and Glaser, C. 2002. The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis-novel genomic variants and functional consequences. *Hum Mutat* 20:404.
 82. Hahn-Dantona, E., Ruiz, J.F., Bornstein, P., and Strickland, D.K. 2001. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* 276:15498-15503.
 83. Donnelly, S., Roake, W., Brown, S., Young, P., Naik, H., Wordsworth, P., Isenberg, D.A., Reid, K.B., and Eggleton, P. 2006. Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:1543-1556.
 84. Salicioni, A.M., Gaultier, A., Brownlee, C., Cheezum, M.K., and Gonias, S.L. 2004. Low density lipoprotein receptor-related protein-1 promotes beta1 integrin maturation and transport to the cell surface. *J Biol Chem* 279:10005-10012.
 85. Sakai, J., Hoshino, A., Takahashi, S., Miura, Y., Ishii, H., Suzuki, H., Kawarabayasi, Y., and Yamamoto, T. 1994. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 269:2173-2182.
 86. Wyne, K.L., Pathak, K., Seabra, M.C., and Hobbs, H.H. 1996. Expression of the VLDL receptor in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:407-415.
 87. Multhaupt, H.A., Gafvels, M.E., Kariko, K., Jin, H., Arenas-Elliot, C., Goldman, B.I., Strauss, J.F., 3rd, Angelin, B., Warhol, M.J., and McCrae, K.R. 1996. Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall. Analysis of human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Am J Pathol* 148:1985-1997.
 88. Kobayashi, K., Oka, K., Forte, T., Ishida, B., Teng, B., Ishimura-Oka, K., Nakamuta, M., and Chan, L. 1996. Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 271:6852-6860.
 89. Argraves, K.M., Kozarsky, K.F., Fallon, J.T., Harpel, P.C., and Strickland, D.K. 1997. The atherogenic lipoprotein Lp(a) is internalized and degraded in a process mediated by the VLDL receptor. *J Clin Invest* 100:2170-2181.
 90. Lusis, A.J., Fogelman, A.M., and Fonarow, G.C. 2004. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 110:1868-1873.
 91. Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the

- Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89:2462-2478.
92. Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B., and Mancini, M. 1999. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1819-1824.
 93. Gordon, D.J., and Rifkind, B.M. 1989. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 321:1311-1316.
 94. Kronenberg, F., Kronenberg, M.F., Kiechl, S., Trenkwalder, E., Santer, P., Oberhollenzer, F., Egger, G., Utermann, G., and Willeit, J. 1999. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 100:1154-1160.
 95. Tsimikas, S., Brilakis, E.S., Miller, E.R., McConnell, J.P., Lennon, R.J., Kornman, K.S., Witztum, J.L., and Berger, P.B. 2005. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 353:46-57.
 96. Luft, F.C. 1998. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens* 16:1871-1878.
 97. Hu, H., Pierce, G.N., and Zhong, G. 1999. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae. *J Clin Invest* 103:747-753.
 98. Furman, M.I., Benoit, S.E., Barnard, M.R., Valeri, C.R., Borbone, M.L., Becker, R.C., Hechtman, H.B., and Michelson, A.D. 1998. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 31:352-358.
 99. Sagastagoitia, J.D., Saez, Y., Vacas, M., Narvaez, I., Saez de Lafuente, J.P., Molinero, E., Magro, A., Lafita, M., Santos, M., Escobar, A., et al. 2006. Association between inflammation, lipid and hemostatic factors in patients with stable angina. *Thromb Res*.
 100. Vaughan, D.E. 2005. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3:1879-1883.
 101. Baker, L., Meldrum, K.K., Wang, M., Sankula, R., Vanam, R., Raiesdana, A., Tsai, B., Hile, K., Brown, J.W., and Meldrum, D.R. 2003. The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res* 115:325-344.
 102. Warrington, K.J., Kent, P.D., Frye, R.L., Lymp, J.F., Kopecky, S.L., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. 2005. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study. *Arthritis Res Ther* 7:R984-991.
 103. Paffen, E., and DeMaat, M.P. 2006. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc Res* 71:30-39.
 104. Grundy, S.M. 2006. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol* 47:1093-1100.
 105. Witztum, J.L., and Steinberg, D. 2001. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 11:93-102.
 106. Libby, P., Ridker, P.M., and Maseri, A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143.
 107. Gimbrone, M.A., Jr. 1999. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 155:1-5.
 108. Boren, J., Olin, K., Lee, I., Chait, A., Wight, T.N., and Innerarity, T.L. 1998. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point

- mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 101:2658-2664.
109. Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., et al. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 196:887-896.
 110. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:333-337.
 111. Stocker, R., and Keaney, J.F., Jr. 2004. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 84:1381-1478.
 112. Kruth, H.S., Jones, N.L., Huang, W., Zhao, B., Ishii, I., Chang, J., Combs, C.A., Malide, D., and Zhang, W.Y. 2005. Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem* 280:2352-2360.
 113. Hegele, R.A. 1999. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med* 31:217-224.
 114. Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Miller, E., Castellani, L.W., Subbanagounder, G., Cheroutre, H., Faull, K.F., Berliner, J.A., Witztum, J.L., et al. 2000. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 275:17527-17535.
 115. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897.
 116. Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2:275-281.
 117. Lesnik, P., Haskell, C.A., and Charo, I.F. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* 111:333-340.
 118. Veillard, N.R., Kwak, B., Pelli, G., Mulhaupt, F., James, R.W., Proudfoot, A.E., and Mach, F. 2004. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res* 94:253-261.
 119. Lutters, B.C., Leeuwenburgh, M.A., Appeldoorn, C.C., Molenaar, T.J., Van Berkel, T.J., and Biessen, E.A. 2004. Blocking endothelial adhesion molecules: a potential therapeutic strategy to combat atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 15:545-552.
 120. Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. 1998. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102:145-152.
 121. Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L., and Beaudet, A.L. 2000. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191:189-194.
 122. Shih, P.T., Brennan, M.L., Vora, D.K., Territo, M.C., Strahl, D., Elices, M.J., Lusis, A.J., and Berliner, J.A. 1999. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res* 84:345-351.
 123. Shih, P.T., Elices, M.J., Fang, Z.T., Ugarova, T.P., Strahl, D., Territo, M.C., Frank, J.S., Kovach, N.L., Cabanas, C., Berliner, J.A., et al. 1999. Minimally

- modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta1 integrin. *J Clin Invest* 103:613-625.
124. Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., and Miyata, M. 1995. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8264-8268.
 125. Swirski, F.K., Pittet, M.J., Kircher, M.F., Aikawa, E., Jaffer, F.A., Libby, P., and Weissleder, R. 2006. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
 126. Bobryshev, Y.V., and Lord, R.S. 1995. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol* 58:307-322.
 127. Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., and Hansson, G.K. 1986. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-138.
 128. Xu, Q. 2002. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1547-1559.
 129. Stemme, S., Faber, B., Holm, J., Wiklund, O., Witztum, J.L., and Hansson, G.K. 1995. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3893-3897.
 130. de Boer, O.J., van der Wal, A.C., Houtkamp, M.A., Ossewaarde, J.M., Teeling, P., and Becker, A.E. 2000. Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to *Chlamydia pneumoniae*. *Cardiovasc Res* 48:402-408.
 131. Frostegard, J., Ulfgren, A.K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U., and Hansson, G.K. 1999. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145:33-43.
 132. Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21:713-758.
 133. Uyemura, K., Demer, L.L., Castle, S.C., Jullien, D., Berliner, J.A., Gately, M.K., Warrier, R.R., Pham, N., Fogelman, A.M., and Modlin, R.L. 1996. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest* 97:2130-2138.
 134. Gupta, S., Pablo, A.M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A.R., and Schindler, C. 1997. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 99:2752-2761.
 135. Whitman, S.C., Ravisankar, P., and Daugherty, A. 2002. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. *J Interferon Cytokine Res* 22:661-670.
 136. Buono, C., Come, C.E., Stavrakis, G., Maguire, G.F., Connelly, P.W., and Lichtman, A.H. 2003. Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:454-460.
 137. Davenport, P., and Tipping, P.G. 2003. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 163:1117-1125.
 138. Branen, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J., and Jovinge, S. 2004. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2137-2142.

139. Buono, C., Binder, C.J., Stavrakis, G., Witztum, J.L., Glimcher, L.H., and Lichtman, A.H. 2005. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1596-1601.
140. Whitman, S.C., Ravisankar, P., Elam, H., and Daugherty, A. 2000. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol* 157:1819-1824.
141. Laurat, E., Poirier, B., Tupin, E., Caligiuri, G., Hansson, G.K., Bariety, J., and Nicoletti, A. 2001. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 104:197-202.
142. Shimizu, K., Shichiri, M., Libby, P., Lee, R.T., and Mitchell, R.N. 2004. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest* 114:300-308.
143. Tupin, E., Nicoletti, A., Elhage, R., Rudling, M., Ljunggren, H.G., Hansson, G.K., and Berne, G.P. 2004. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. *J Exp Med* 199:417-422.
144. Ludewig, B., Freigang, S., Jaggi, M., Kurrer, M.O., Pei, Y.C., Vlk, L., Odermatt, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. 2000. Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12752-12757.
145. Miller, Y.I., Chang, M.K., Binder, C.J., Shaw, P.X., and Witztum, J.L. 2003. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol* 14:437-445.
146. Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K., and Yan, Z.Q. 2002. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105:1158-1161.
147. DeGaba, T.J. 2004. Immunogenetic susceptibility of atherosclerotic stroke: implications on current and future treatment of vascular inflammation. *Stroke* 35:2712-2719.
148. Heinecke, J.W., Rosen, H., and Chait, A. 1984. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 74:1890-1894.
149. Podrez, E.A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R.L., Hajjar, D.P., Cohen, P.A., Frazier, W.A., Hoff, H.F., and Hazen, S.L. 2000. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 105:1095-1108.
150. Marathe, S., Kuriakose, G., Williams, K.J., and Tabas, I. 1999. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2648-2658.
151. Ivandic, B., Castellani, L.W., Wang, X.P., Qiao, J.H., Mehrabian, M., Navab, M., Fogelman, A.M., Grass, D.S., Swanson, M.E., de Beer, M.C., et al. 1999. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1284-1290.
152. Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., and Funk, C.D. 1999. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 103:1597-1604.

153. Wintergerst, E.S., Jelk, J., Rahner, C., and Asmis, R. 2000. Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *Eur J Biochem* 267:6050-6059.
154. Krieger, M. 1997. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* 8:275-280.
155. van Berkel, T.J., Out, R., Hoekstra, M., Kuiper, J., Biessen, E., and van Eck, M. 2005. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 16:525-535.
156. Naito, M., Suzuki, H., Mori, T., Matsumoto, A., Kodama, T., and Takahashi, K. 1992. Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 141:591-599.
157. Daugherty, A., Cornicelli, J.A., Welch, K., Sendobry, S.M., and Rateri, D.L. 1997. Scavenger receptors are present on rabbit aortic endothelial cells in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2369-2375.
158. Hiltunen, T.P., Luoma, J.S., Nikkari, T., and Yla-Herttuala, S. 1998. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation* 97:1079-1086.
159. Yoshida, H., Quehenberger, O., Kondratenko, N., Green, S., and Steinberg, D. 1998. Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:794-802.
160. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., et al. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386:292-296.
161. Sakaguchi, H., Takeya, M., Suzuki, H., Hakamata, H., Kodama, T., Horiuchi, S., Gordon, S., van der Laan, L.J., Kraal, G., Ishibashi, S., et al. 1998. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 78:423-434.
162. de Winther, M.P., Gijbels, M.J., van Dijk, K.W., van Gorp, P.J., Suzuki, H., Kodama, T., Frants, R.R., Havekes, L.M., and Hofker, M.H. 1999. Scavenger receptor deficiency leads to more complex atherosclerotic lesions in APOE3Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 144:315-321.
163. Linton, M.F., and Fazio, S. 2001. Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 12:489-495.
164. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520.
165. Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., and Tall, A.R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 272:20982-20985.
166. Rigotti, A., Acton, S.L., and Krieger, M. 1995. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270:16221-16224.
167. Out, R., Hoekstra, M., Spijkers, J.A., Kruijt, J.K., van Eck, M., Bos, I.S., Twisk, J., and Van Berkel, T.J. 2004. Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J Lipid Res* 45:2088-2095.

168. Covey, S.D., Krieger, M., Wang, W., Penman, M., and Trigatti, B.L. 2003. Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1589-1594.
169. Trigatti, B., Rayburn, H., Vinals, M., Braun, A., Miettinen, H., Penman, M., Hertz, M., Schrenzel, M., Amigo, L., Rigotti, A., et al. 1999. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9322-9327.
170. Braun, A., Trigatti, B.L., Post, M.J., Sato, K., Simons, M., Edelberg, J.M., Rosenberg, R.D., Schrenzel, M., and Krieger, M. 2002. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 90:270-276.
171. Van Eck, M., Bos, I.S., Hildebrand, R.B., Van Rij, B.T., and Van Berkel, T.J. 2004. Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am J Pathol* 165:785-794.
172. Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., and Silverstein, R.L. 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274:19055-19062.
173. Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., and Silverstein, R.L. 2000. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105:1049-1056.
174. Febbraio, M., Guy, E., and Silverstein, R.L. 2004. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2333-2338.
175. Guy, E., Kuchibhotla, S., Silverstein, R., and Febbraio, M. 2006. Continued inhibition of atherosclerotic lesion development in long term Western diet fed CD36 degrees /apoE degrees mice. *Atherosclerosis*.
176. Lipscomb, M.F., and Masten, B.J. 2002. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 82:97-130.
177. Bobryshev, Y.V. 2005. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance. *Eur Heart J* 26:1700-1704.
178. Adachi, H., and Tsujimoto, M. 2002. FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities. *J Biol Chem* 277:34264-34270.
179. Tamura, Y., Adachi, H., Osuga, J., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., Okazaki, H., Tomita, S., Iizuka, Y., Shimano, H., et al. 2003. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 278:12613-12617.
180. Salmi, M., Koskinen, K., Henttinen, T., Elimä, K., and Jalkanen, S. 2004. CLEVER-1 mediates lymphocyte transmigration through vascular and lymphatic endothelium. *Blood* 104:3849-3857.
181. Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
182. Bjorkbacka, H., Kunjathoor, V.V., Moore, K.J., Koehn, S., Ordija, C.M., Lee, M.A., Means, T., Halmen, K., Luster, A.D., Golenbock, D.T., et al. 2004. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 10:416-421.

183. Mach, F., Schonbeck, U., Bonnefoy, J.Y., Pober, J.S., and Libby, P. 1997. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 96:396-399.
184. Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G.K., Atkinson, E., and Libby, P. 1998. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 394:200-203.
185. Lutgens, E., Gorelik, L., Daemen, M.J., de Muinck, E.D., Grewal, I.S., Koteliansky, V.E., and Flavell, R.A. 1999. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med* 5:1313-1316.
186. Klein, L.W. 2005. Clinical implications and mechanisms of plaque rupture in the acute coronary syndromes. *Am Heart Hosp J* 3:249-255.
187. Falk, E., Shah, P.K., and Fuster, V. 1995. Coronary plaque disruption. *Circulation* 92:657-671.
188. Bobryshev, Y.V., and Lord, R.S. 1995. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res* 29:689-696.
189. Kovanen, P.T., Kaartinen, M., and Paavonen, T. 1995. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 92:1084-1088.
190. Jones, C.B., Sane, D.C., and Herrington, D.M. 2003. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 59:812-823.
191. Liu, J., Sukhova, G.K., Sun, J.S., Xu, W.H., Libby, P., and Shi, G.P. 2004. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1359-1366.
192. Watson, K.E., Bostrom, K., Ravindranath, R., Lam, T., Norton, B., and Demer, L.L. 1994. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 93:2106-2113.
193. Hobbs, H.H., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1:445-466.
194. Young, S.G., and Fielding, C.J. 1999. The ABCs of cholesterol efflux. *Nat Genet* 22:316-318.
195. Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., et al. 2000. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 24:192-196.
196. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P., et al. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22:352-355.
197. Fajans, S.S., Bell, G.I., and Polonsky, K.S. 2001. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *N Engl J Med* 345:971-980.
198. Geller, D.S., Farhi, A., Pinkerton, N., Fradley, M., Moritz, M., Spitzer, A., Meinke, G., Tsai, F.T., Sigler, P.B., and Lifton, R.P. 2000. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289:119-123.
199. Brown, M.S., Kovanen, P.T., and Goldstein, J.L. 1981. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 212:628-635.
200. Cohen, J.C., Wang, Z., Grundy, S.M., Stoesz, M.R., and Guerra, R. 1994. Variation at the hepatic lipase and apolipoprotein AI/CIII/AIV loci is a major

- cause of genetically determined variation in plasma HDL cholesterol levels. *J Clin Invest* 94:2377-2384.
201. Forrester, J.S., Makkar, R., and Shah, P.K. 2005. Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition: an update for clinicians. *Circulation* 111:1847-1854.
 202. Boer, J.M., Kuivenhoven, J.A., Feskens, E.J., Schouten, E.G., Havekes, L.M., Seidell, J.C., Kastelein, J.J., and Kromhout, D. 1999. Physical activity modulates the effect of a lipoprotein lipase mutation (D9N) on plasma lipids and lipoproteins. *Clin Genet* 56:158-163.
 203. Chen, Z., Karaplis, A.C., Ackerman, S.L., Pogribny, I.P., Melnyk, S., Lussier-Cacan, S., Chen, M.F., Pai, A., John, S.W., Smith, R.S., et al. 2001. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 10:433-443.
 204. Fowkes, F.G., Connor, J.M., Smith, F.B., Wood, J., Donnan, P.T., and Lowe, G.D. 1992. Fibrinogen genotype and risk of peripheral atherosclerosis. *Lancet* 339:693-696.
 205. Yamada, Y., Izawa, H., Ichihara, S., Takatsu, F., Ishihara, H., Hirayama, H., Sone, T., Tanaka, M., and Yokota, M. 2002. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 347:1916-1923.
 206. Lindpaintner, K., Lee, M., Larson, M.G., Rao, V.S., Pfeffer, M.A., Ordovas, J.M., Schaefer, E.J., Wilson, A.F., Wilson, P.W., Vasan, R.S., et al. 1996. Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N Engl J Med* 334:1023-1028.
 207. Tuomainen, T.P., Kontula, K., Nyyssonen, K., Lakka, T.A., Helio, T., and Salonen, J.T. 1999. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation : a prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 100:1274-1279.
 208. Hingorani, A.D., Liang, C.F., Fatibene, J., Lyon, A., Monteith, S., Parsons, A., Haydock, S., Hopper, R.V., Stephens, N.G., O'Shaughnessy, K.M., et al. 1999. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100:1515-1520.
 209. Gretarsdottir, S., Thorleifsson, G., Reynisdottir, S.T., Manolescu, A., Jonsdottir, S., Jonsdottir, T., Gudmundsdottir, T., Bjarnadottir, S.M., Einarsson, O.B., Gudjonsdottir, H.M., et al. 2003. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat Genet* 35:131-138.
 210. Worrall, B.B., Azhar, S., Nyquist, P.A., Ackerman, R.H., Hamm, T.L., and DeGraba, T.J. 2003. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in carotid atherosclerosis. *Stroke* 34:790-793.
 211. Ameziane, N., Beillat, T., Verpillat, P., Chollet-Martin, S., Aumont, M.C., Seknadji, P., Lamotte, M., Lebre, D., Ollivier, V., and de Prost, D. 2003. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:e61-64.
 212. Rader, D.J., Cohen, J., and Hobbs, H.H. 2003. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 111:1795-1803.
 213. Sun, X.M., Patel, D.D., Webb, J.C., Knight, B.L., Fan, L.M., Cai, H.J., and Soutar, A.K. 1994. Familial hypercholesterolemia in China. Identification of

- mutations in the LDL-receptor gene that result in a receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb* 14:85-94.
214. Zschocke, J., and Schaefer, J.R. 2003. Homozygous familial hypercholesterolaemia in identical twins. *Lancet* 361:1641.
 215. Hoeg, J.M., Feuerstein, I.M., and Tucker, E.E. 1994. Detection and quantitation of calcific atherosclerosis by ultrafast computed tomography in children and young adults with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 14:1066-1074.
 216. Hill, J.S., Hayden, M.R., Frohlich, J., and Pritchard, P.H. 1991. Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 11:290-297.
 217. Miettinen, T.A., and Gylling, H. 1999. Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr Opin Lipidol* 10:9-14.
 218. Van Heek, M., France, C.F., Compton, D.S., McLeod, R.L., Yumibe, N.P., Alton, K.B., Sybertz, E.J., and Davis, H.R., Jr. 1997. In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. *J Pharmacol Exp Ther* 283:157-163.
 219. Thompson, G.R. 2003. LDL apheresis. *Atherosclerosis* 167:1-13.
 220. Starzl, T.E., Bilheimer, D.W., Bahnson, H.T., Shaw, B.W., Jr., Hardesty, R.L., Griffith, B.P., Iwatsuki, S., Zitelli, B.J., Gartner, J.C., Jr., Malatack, J.J., et al. 1984. Heart-liver transplantation in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1:1382-1383.
 221. Grossman, M., Raper, S.E., Kozarsky, K., Stein, E.A., Engelhardt, J.F., Muller, D., Lupien, P.J., and Wilson, J.M. 1994. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6:335-341.
 222. Grossman, M., Rader, D.J., Muller, D.W., Kolansky, D.M., Kozarsky, K., Clark, B.J., 3rd, Stein, E.A., Lupien, P.J., Brewer, H.B., Jr., Raper, S.E., et al. 1995. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1:1148-1154.
 223. Raper, S.E., Grossman, M., Rader, D.J., Thoene, J.G., Clark, B.J., 3rd, Kolansky, D.M., Muller, D.W., and Wilson, J.M. 1996. Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg* 223:116-126.
 224. Soufi, M., Sattler, A.M., Maerz, W., Starke, A., Herzum, M., Maisch, B., and Schaefer, J.R. 2004. A new but frequent mutation of apoB-100-apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis* 174:11-16.
 225. Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat* 4:249-264.
 226. Hochberg, Y., and Benjamini, Y. 1990. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 9:811-818.
 227. Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4:P3.
 228. Hosack, D.A., Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. 2003. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4:R70.
 229. Havel, R.J., Eder, H.A., and Bragdon, J.H. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34:1345-1353.

230. Han, C.Y., and Pak, Y.K. 1999. Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med* 31:165-173.
231. Puhl, H., Waeg, G., and Esterbauer, H. 1994. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol* 233:425-441.
232. el-Saadani, M., Esterbauer, H., el-Sayed, M., Goher, M., Nassar, A.Y., and Jurgens, G. 1989. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 30:627-630.
233. Whitney, A.R., Diehn, M., Popper, S.J., Alizadeh, A.A., Boldrick, J.C., Relman, D.A., and Brown, P.O. 2003. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1896-1901.
234. Palmer, C., Diehn, M., Alizadeh, A.A., and Brown, P.O. 2006. Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics* 7:115.
235. Green, K.J., Rowbottom, D.G., and Mackinnon, L.T. 2002. Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *J Appl Physiol* 92:2390-2395.
236. Mooren, F.C., Bloming, D., Lechtermann, A., Lerch, M.M., and Volker, K. 2002. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol* 93:147-153.
237. Mooren, F.C., Lechtermann, A., and Volker, K. 2004. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Med Sci Sports Exerc* 36:1476-1483.
238. de Vries, J.E., Yssel, H., and Spits, H. 1989. Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* 109:119-141.
239. Kern, F., Docke, W.D., Reinke, P., and Volk, H.D. 1994. Discordant expression of LFA-1, VLA-4alpha, VLA-beta 1, CD45RO and CD28 on T-cell subsets: evidence for multiple subsets of 'memory' T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 104:17-26.
240. Gray-Owen, S.D., Dehio, C., Haude, A., Grunert, F., and Meyer, T.F. 1997. CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *Embo J* 16:3435-3445.
241. Campbell, J.J., Murphy, K.E., Kunkel, E.J., Brightling, C.E., Soler, D., Shen, Z., Boisvert, J., Greenberg, H.B., Vierra, M.A., Goodman, S.B., et al. 2001. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166:877-884.
242. Bruunsgaard, H., Jensen, M.S., Schjerling, P., Halkjaer-Kristensen, J., Ogawa, K., Skinhoj, P., and Pedersen, B.K. 1999. Exercise induces recruitment of lymphocytes with an activated phenotype and short telomeres in young and elderly humans. *Life Sci* 65:2623-2633.
243. Wang, J.S., and Huang, Y.H. 2005. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur J Appl Physiol* 95:290-297.
244. Buettner, P., Mosig, S., Lechtermann, A., Funke, H., and Mooren, F.C. 2006. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *J Appl Physiol*.
245. PCA Analysis at Wikipedia.org:
http://en.wikipedia.org/wiki/Principal_component_analysis.
246. Neufeld, E.B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A.M., Dwyer, N.K., Roff, C.F., Ohno, K., Morris, J.A., Carstea, E.D., et al. 1999. The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem* 274:9627-9635.

247. Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sanchez- Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F. 1993. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J. Exp. Med.* 178:537-547.
248. Antonenkov, V.D., Croes, K., Waelkens, E., Van Veldhoven, P.P., and Mannaerts, G.P. 2000. Identification, purification and characterization of an acetoacetyl-CoA thiolase from rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem* 267:2981-2990.
249. Imhof, B.A., and Aurrand-Lions, M. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 4:432-444.
250. Gordon, S., and Taylor, P.R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.
251. Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.
252. Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., and Protter, A.A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 268:11811-11816.
253. Pfützner, A., Kost, I., Löbig, M., Knesovic, M., Arbruster, F.P., and Forst, T. 2005. Clinical Evaluation of a new ELISA Method for Determination of oxidized LDLPartikels - a potential marker for Atherosclerosis in Diabetes melitus. *Abstract of the 5th Diabetes Technolgy Meeting, San Francisco.*
254. Puente Navazo, M.D., Daviet, L., Ninio, E., and McGregor, J.L. 1996. Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1033-1039.
255. Kapinsky, M., Torzewski, M., Buchler, C., Duong, C.Q., Rothe, G., and Schmitz, G. 2001. Enzymatically Degraded LDL Preferentially Binds to CD14^{high} CD16⁺ Monocytes and Induces Foam Cell Formation Mediated Only in Part by the Class B Scavenger-Receptor CD36. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1004-1010.
256. Stacker, S.A., and Springer, T.A. 1991. Leukocyte integrin P150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. *J Immunol* 146:648-655.
257. Brown, K.A., Bedford, P., Macey, M., McCarthy, D.A., Leroy, F., Vora, A.J., Stagg, A.J., Dumonde, D.C., and Knight, S.C. 1997. Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin Exp Immunol* 107:601-607.
258. Amano, H., Amano, E., Santiago-Raber, M.L., Moll, T., Martinez-Soria, E., Fossati-Jimack, L., Iwamoto, M., Rozzo, S.J., Kotzin, B.L., and Izui, S. 2005. Selective expansion of a monocyte subset expressing the CD11c dendritic cell marker in the Yaa model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:2790-2798.
259. Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T., and Srivastava, P.K. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14:303-313.
260. Patel, M., Morrow, J., Maxfield, F.R., Strickland, D.K., Greenberg, S., and Tabas, I. 2003. The cytoplasmic domain of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein, but not that of the LDL receptor, triggers phagocytosis. *J Biol Chem* 278:44799-44807.

261. Christensen, R.D., and Hill, H.R. 1987. Exercise-induced changes in the blood concentration of leukocyte populations in teenage athletes. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 9:140-142.
262. Green, K.J., Croaker, S.J., and Rowbottom, D.G. 2003. Carbohydrate supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. *J Appl Physiol* 95:1216-1223.
263. Green, K.J., Rowbottom, D.G., and Mackinnon, L.T. 2003. Acute exercise and T-lymphocyte expression of the early activation marker CD69. *Med Sci Sports Exerc* 35:582-588.
264. Canales, R.D., Luo, Y., Willey, J.C., Austermiller, B., Barbacioru, C.C., Boysen, C., Hunkapiller, K., Jensen, R.V., Knight, C.R., Lee, K.Y., et al. 2006. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol* 24:1115-1122.
265. Guo, L., Lobenhofer, E.K., Wang, C., Shippy, R., Harris, S.C., Zhang, L., Mei, N., Chen, T., Herman, D., Goodsaid, F.M., et al. 2006. Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms. *Nat Biotechnol* 24:1162-1169.
266. Patterson, T.A., Lobenhofer, E.K., Fulmer-Smentek, S.B., Collins, P.J., Chu, T.M., Bao, W., Fang, H., Kawasaki, E.S., Hager, J., Tikhonova, I.R., et al. 2006. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the Microarray Quality Control (MAQC) project. *Nat Biotechnol* 24:1140-1150.
267. Shi, L., Shi, L., Reid, L.H., Jones, W.D., Shippy, R., Warrington, J.A., Baker, S.C., Collins, P.J., de Longueville, F., Kawasaki, E.S., et al. 2006. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24:1151-1161.
268. Tong, W., Lucas, A.B., Shippy, R., Fan, X., Fang, H., Hong, H., Orr, M.S., Chu, T.M., Guo, X., Collins, P.J., et al. 2006. Evaluation of external RNA controls for the assessment of microarray performance. *Nat Biotechnol* 24:1132-1139.
269. Chtanova, T., Newton, R., Liu, S.M., Weininger, L., Young, T.R., Silva, D.G., Bertoni, F., Rinaldi, A., Chappaz, S., Sallusto, F., et al. 2005. Identification of T cell-restricted genes, and signatures for different T cell responses, using a comprehensive collection of microarray datasets. *J Immunol* 175:7837-7847.
270. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-340.
271. Srivastava, R.A., Ito, H., Hess, M., Srivastava, N., and Schonfeld, G. 1995. Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 and Caco2 cells by palmitate, oleate, and 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Res* 36:1434-1446.
272. Mazzone, T., and Basheeruddin, K. 1991. Dissociated regulation of macrophage LDL receptor and apolipoprotein E gene expression by sterol. *J Lipid Res* 32:507-514.
273. Xie, C., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. 1999. Cholesterol accumulation in tissues of the Niemann-pick type C mouse is determined by the rate of lipoprotein-cholesterol uptake through the coated-pit pathway in each organ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11992-11997.
274. Rigamonti, E., Helin, L., Lestavel, S., Mutka, A.L., Lepore, M., Fontaine, C., Bouhrel, M.A., Bultel, S., Fruchart, J.C., Ikonen, E., et al. 2005. Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ Res* 97:682-689.

275. Frolov, A., Zielinski, S.E., Crowley, J.R., Dudley-Rucker, N., Schaffer, J.E., and Ory, D.S. 2003. NPC1 and NPC2 Regulate Cellular Cholesterol Homeostasis through Generation of Low Density Lipoprotein Cholesterol-derived Oxysterols. *J. Biol. Chem.* 278:25517-25525.
276. Herz, J., and Strickland, D.K. 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108:779-784.
277. Swarnakar, S., Beers, J., Strickland, D.K., Azhar, S., and Williams, D.L. 2001. The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 276:21121-21128.
278. Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Camino-Lopez, S., Costales, P., and Badimon, L. 2006. Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:117-123.
279. Jones, N.L., Reagan, J.W., and Willingham, M.C. 2000. The pathogenesis of foam cell formation: modified LDL stimulates uptake of co-incubated LDL via macropinocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:773-781.
280. Han, J., Hajjar, D.P., Febbraio, M., and Nicholson, A.C. 1997. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 272:21654-21659.
281. Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A., and Vega, M.A. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 39:777-788.
282. Feng, J., Han, J., Pearce, S.F., Silverstein, R.L., Gotto, A.M., Jr., Hajjar, D.P., and Nicholson, A.C. 2000. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res* 41:688-696.
283. Han, S., and Sidell, N. 2002. Peroxisome-proliferator-activated-receptor gamma (PPARgamma) independent induction of CD36 in THP-1 monocytes by retinoic acid. *Immunology* 106:53-59.
284. Rahaman, S.O., Lennon, D.J., Febbraio, M., Podrez, E.A., Hazen, S.L., and Silverstein, R.L. 2006. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 4:211-221.
285. Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J., Kameda-Takemura, K., et al. 1995. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest* 96:1859-1865.
286. Hayden, J.M., Brachova, L., Higgins, K., Obermiller, L., Sevanian, A., Khandrika, S., and Reaven, P.D. 2002. Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J. Lipid Res.* 43:26-35.
287. Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. 2006. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* 1761:655-666.
288. Jessup, W., Gelissen, I.C., Gaus, K., and Kritharides, L. 2006. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol* 17:247-257.

289. Oram, J.F. 2002. The cholesterol mobilizing transporter ABCA1 as a new therapeutic target for cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 12:170-175.
290. Zhu, Y., Liao, H., Xie, X., Yuan, Y., Lee, T.S., Wang, N., Wang, X., Shyy, J.Y., and Stemerman, M.B. 2005. Oxidized LDL downregulates ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells via inhibiting liver X receptor (LXR). *Cardiovasc Res* 68:425-432.
291. Favari, E., Zimetti, F., Bortnick, A.E., Adorni, M.P., Zanotti, I., Canavesi, M., and Bernini, F. 2005. Impaired ATP-binding cassette transporter A1-mediated sterol efflux from oxidized LDL-loaded macrophages. *FEBS Lett* 579:6537-6542.
292. Choi, H.Y., Karten, B., Chan, T., Vance, J.E., Greer, W.L., Heidenreich, R.A., Garver, W.S., and Francis, G.A. 2003. Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* 278:32569-32577.
293. Wong, J., Quinn, C.M., and Brown, A.J. 2006. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1 by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem J*.
294. Tsimikas, S., Palinski, W., and Witztum, J.L. 2001. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:95-100.
295. Binder, C.J., and Silverman, G.J. 2005. Natural antibodies and the autoimmunity of atherosclerosis. *Springer Semin Immunopathol* 26:385-404.
296. Hulthe, J. 2004. Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development--clinical and animal studies. *Clin Chim Acta* 348:1-8.
297. Toubi, E., and Shoenfeld, Y. 2005. Predictive and protective autoimmunity in cardiovascular diseases: is vaccination therapy a reality? *Lupus* 14:665-669.
298. Qin, W., Infante, J., Wang, S.R., and Infante, R. 1992. Regulation of HMG-CoA reductase, apoprotein-B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1127:57-66.
299. Reihner, E., Rudling, M., Stahlberg, D., Berglund, L., Ewerth, S., Bjorkhem, I., Einarsson, K., and Angelin, B. 1990. Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol. *N Engl J Med* 323:224-228.
300. Perrin-Cocon, L., Coutant, F., Agaue, S., Deforges, S., Andre, P., and Lotteau, V. 2001. Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte. *J Immunol* 167:3785-3791.
301. Coutant, F., Agaue, S., Perrin-Cocon, L., Andre, P., and Lotteau, V. 2004. Sensing environmental lipids by dendritic cell modulates its function. *J Immunol* 172:54-60.
302. Coutant, F., Perrin-Cocon, L., Agaue, S., Delair, T., Andre, P., and Lotteau, V. 2002. Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine. *J Immunol* 169:1688-1695.
303. Weis, M., Schlichting, C.L., Engleman, E.G., and Cooke, J.P. 2002. Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1817-1823.
304. Lord, R.S., and Bobryshev, Y.V. 1999. Clustering of dendritic cells in atheroprone areas of the aorta. *Atherosclerosis* 146:197-198.
305. Millonig, G., Malcom, G.T., and Wick, G. 2002. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological

- Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis* 160:441-448.
306. Bobryshev, Y.V., and Lord, R.S. 1998. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res* 37:799-810.
 307. Yilmaz, A., Lochno, M., Traeg, F., Cicha, I., Reiss, C., Stumpf, C., Raaz, D., Anger, T., Amann, K., Probst, T., et al. 2004. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis* 176:101-110.
 308. Bobryshev, Y.V., and Lord, R.S. 2005. Co-accumulation of dendritic cells and natural killer T cells within rupture-prone regions in human atherosclerotic plaques. *J Histochem Cytochem* 53:781-785.
 309. Banchereau, J., and Steinman, R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
 310. Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
 311. Bottcher, A., Gaip, U.S., Furnrohr, B.G., Herrmann, M., Girkontaite, I., Kalden, J.R., and Voll, R.E. 2006. Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis Rheum* 54:927-938.
 312. Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., and Henson, P.M. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.
 313. Miller, Y.I., Viriyakosol, S., Binder, C.J., Feramisco, J.R., Kirkland, T.N., and Witztum, J.L. 2003. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 278:1561-1568.
 314. Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Kockx, M.M., Herman, A.G., and Martinet, W. 2005. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1256-1261.
 315. Nicoletti, A., Caligiuri, G., Tornberg, I., Kodama, T., Stemme, S., and Hansson, G.K. 1999. The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. *Eur J Immunol* 29:512-521.
 316. Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and Freeman, M.W. 2002. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 277:49982-49988.
 317. Silverstein, R.L., and Febbraio, M. 2000. CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11:483-491.
 318. Yamashita, S., Hirano, K.I., Kuwasako, T., Janabi, M., Toyama, Y., Ishigami, M., and Sakai, N. 2006. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients. *Mol Cell Biochem*.
 319. Tanaka, T., Sohmiya, K., and Kawamura, K. 1997. Is CD36 deficiency an etiology of hereditary hypertrophic cardiomyopathy? *J Mol Cell Cardiol* 29:121-127.
 320. Nozaki, S., Tanaka, T., Yamashita, S., Sohmiya, K., Yoshizumi, T., Okamoto, F., Kitaura, Y., Kotake, C., Nishida, H., Nakata, A., et al. 1999. CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myocardium: complete myocardial

- accumulation defect of radiolabeled long-chain fatty acid analog in subjects with CD36 deficiency. *Mol Cell Biochem* 192:129-135.
321. Major, A.S., Singh, R.R., Joyce, S., and Van Kaer, L. 2006. The role of invariant natural killer T cells in lupus and atherogenesis. *Immunol Res* 34:49-66.
322. Bobryshev, Y.V. 2005. Natural killer T cells in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:e40; author reply e40.
323. van de Vijver, M.J., He, Y.D., van't Veer, L.J., Dai, H., Hart, A.A., Voskuil, D.W., Schreiber, G.J., Peterse, J.L., Roberts, C., Marton, M.J., et al. 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999-2009.
324. Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Raffeld, M., et al. 2001. Gene-Expression Profiles in Hereditary Breast Cancer. *N Engl J Med* 344:539-548.
325. Kern, W., Kohlmann, A., Schnittger, S., Hiddemann, W., Schoch, C., and Haferlach, T. 2004. Gene expression profiling as a diagnostic tool in acute myeloid leukemia. *Am J Pharmacogenomics* 4:225-237.

II. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre,

... dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

... dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität Jena bekannt ist.

... dass ich weder die vorliegende Doktorarbeit noch Teile dieser für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, den 20.10.2007

Sandy Mosig

III. Danksagung

Ich danke allen Personen, die Anteil am Entstehen dieser Arbeit gehabt haben.

Dies gilt allen voran den Patienten und Probanden, welche sich im Rahmen dieser Studie für Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen Petra Büttner, Barbara Kühn, Kerstin Neunübel und Dr. rer. nat. Knut Rennert bedanken, ohne die dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich natürlich meinem Chef Prof. Dr. med. Harald Funke danken, welcher mich bei der Planung und Durchführung dieser Studie sehr unterstützt hat und mir damit die Gelegenheit gegeben hat dieses für mich sehr interessante Thema zu bearbeiten.

Ich möchte mich ebenso bei Prof. Dr. R. Wetzker bedanken, welcher diese Arbeit betreut hat.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. med. Kurt Oette, Prof. Dr. Dr. h.c. H. Borberg, Dr. med. T. Schreiner, Frau Rubel und den gesamten Mitarbeiter des Deutschen Hämapherese Zentrums Köln dafür, dass sie mir Zugang zu ihren Patienten gewährten und mich tatkräftig bei der Gewinnung der Blutproben unterstützt haben.

Weiterhin danken möchte ich Dr. rer. nat. M. Soufie, welcher die Mutationsanalysen der FH-Patienten durchführte, sowie Prof. Dr. med. J. Schäfer und Prof. Dr. med. G. Klaus, die mir den Zugang zu den Marburger FH-Patienten gewährten.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. rer. nat. R. Heller und Dr. rer. nat. S. Krause, welche mir das benötigte LDL zur Verfügung stellten und deren Ratschläge sehr wertvoll waren.

Am meisten danke ich jedoch meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist und ohne deren unermüdliche Unterstützung und Beistand ich nicht in der Lage gewesen diese Arbeit vorzulegen.

Ich möchte weiterhin allen anderen an dieser Arbeit beteiligten Personen danken, die ich hier nicht einzeln nenne konnte.

Vielen Dank !

IV. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sandy
Vorname: Mosig
Geburtsdatum: 09. 01. 1976
Geburtsort: Eilenburg

Schulische Ausbildung

1982 - 1990 Oberschule Jesewitz
1990 - 1992 EOS Eilenburg
1992 - 1995 Gymnasium Eilenburg

Akademische Laufbahn

1997 - 2002 Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

2002 Diplomarbeit „Permissive Funktion der Phosphatidylinositol-3-kinas α bei der Regulation von basalen Ras-GTP in COS7 Zellen“, Forschungsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ Medizinische Fakultät der FSU Jena, Betreuung Dr. I. Rubio

2002 Abschluss als Diplom Biochemiker (Note 1,1 sehr gut)

2004 - 2006 Promotionsarbeit „Untersuchung von atherosklerotischen Prozessen in zirkulierenden Monozyten und T-Zellen von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie“, Institut für Vaskuläre Medizin, Molekulare Hämostaseologie, Medizinische Fakultät der FSU Jena, Betreuung Prof. Dr. med. H. Funke

V. Publikationen und Vorträge

Buettner, P, Mosig, S, Lechtermann, A, Funke, H, and Mooren, F.C. 2006. „Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells.” *J Appl Physiol.*, 2006

Buettner, P, Mosig, S., Funke, H. “Gene expression profiles of T-lymphocytes are sensitive to the influence of heavy smoking. A pilot study.” *Immunogenetics*, *in Press*

Mosig, S., Büttner, P., Gläser, D., Hilberg T., Mooren, FC., Funke, H. „Gene expression profiles in white blood cells: Improved lower limit of assay sensitivity in isolated T-cells“, *in preparation*

Mosig S., Rennert K., Büttner P., Soufi M., Krause S., Kzhyshkowska J., Goerdts S., Heller R., Schaefer J., Funke H. „Imprints of atherosclerosis are present in circulating monocytes of patients with Familial Hypercholesterolemia“, *in preparation*

Büttner P., Vogt S., Heinrich, L., Schmid, A, Schumacher, YO, Dickhuth, HH., Baumstark, MW., Brandenburg, A., Jakob, E., Mosig, S., Funke, H., „Expressing the Tour de France“, *in preparation*

Posterpräsentationen

„Analysis of Gene Expression Profiles from White Blood Cells“, Mosig S., Buettner P., Funke H. ; 1. Deutscher Atheroskleroskongress 2004, Leipzig

„Standardisation of Preanalytic Procedures in Microarray Analyses“, Mosig S., Büttner P., Hildner M., Funke H.; Swiss Med Lab 2004, Luzern; 1st Poster Award

“Effekts of Physical Training are reflected in Gene Expression Profiles of White Blood Cells“, Büttner, P., Mosig, S., Lechtermann, A., Mooren, FC., Funke H. Swiss Med Lab 2004, Luzern; 3rd Poster Award

„Alterations in the Metabolism of Monocytes and T cells in Patients with Familial Hypercholesterolemia“; Mosig S., Soufi M., Büttner P. Schäfer J., Oette K. Keller C., Funke H.; European Lipoprotein Club 2005, Tutzing

„Monocytes of patients with Familial Hypercholesterolemia have a compensatory increased expression of scavenger receptors due to Low Density Lipoprotein Receptor gene defect with elevated uptake of native and mildly oxidised LDL“, Mosig S., Büttner P., Rennert K., Schäfer J., Soufi M., Oette K., Schreiner T., Krause S., Heller R., Funke H.; DGKL Jahrestagung 2006, Mannheim

„Circulating Monocytes Response to LDL Receptor Defects“, Mosig S., Büttner P, Rennert K., Schäfer J., Soufi M., Oette K., Schreiner T., Krause S., Heller R., Funke H.; European Lipoprotein Club 2006, Tutzing

Vorträge:

“Analysis of Gen Expression Profiles from White Blood Cells“, 34. Jahrestagung des Arbeitskreises "Klinischer Lipidstoffwechsel" 2004, Maikammer

„Genexpressionsprofile in weißen Blutzellen: Qualitätssicherung und diagnostische Konzeptionen“, DGKL Kongress 2004, Düsseldorf

VI. Erklärung zum Promotionsverfahren

Hiermit erkläre ich, Sandy Mosig, bisher kein Promotionsverfahren eröffnet zu haben.

Jena, den 9.11.2006

Sandy Mosig